



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 07 FEV. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

PHOTOCOPIED FROM THE ORIGINAL FILED IN THE OFFICE OF THE SECRETARY OF DEFENSE

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **1 OCT 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9912317**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS B**  
DATE DE DÉPÔT **01 OCT. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET REGIMBEAU**  
*20 rue de Chazelles*  
*75847 Paris cedex 17*

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande  
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

**238065 D18426 EMP**

**01 45 00 92 02**

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

*« Dispositif d'analyse biochimique comprenant un substrat microfluidique notamment  
pour l'amplification ou l'analyse d'acides nucléiques ».*

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**GENSET**

**COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE**

Forme juridique

**SOCIETE ANONYME, ETABLISSEMENT PUBLIC  
A CARACTERE SCIENTIFIQUE, TECHNIQUE ET  
INDUSTRIEL**

Nationalité (s)

**Française, Française**

Adresse (s) complète (s)

**24, rue Royale, 75008 PARIS,  
31-33, rue de la Fédération, 75015 PARIS**

Pays

**FR  
FR**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

*[Signature]*  
**92-1284**

*[Signature]*

DÉPARTEMENT DES BREVETS

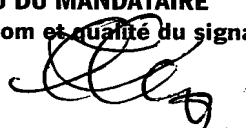
26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1 / 2

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) 238065 D18426 EMP			
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		99 12317	
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>  Dispositif microfluidique.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>  GENSET : 24, rue Royale, 75008 PARIS - FRANCE  COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33, rue de la Fédération, 75015 PARIS FRANCE			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).</b>			
Nom		FOUILLET Yves	
Prénoms			
Adresse	Rue	Chemin des carrières, Le Chevalon de Voreppe, 38340 VOREPPE, FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VAUCHIER Claude	
Prénoms			
Adresse	Rue	2 impasse Lartigues, 38120 SAINT-EGREVE, FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CLERC Jean-Frédéric	
Prénoms			
Adresse	Rue	8 rue du Mont Perthuis, Le Fontanil-Cornillon, 38120 SAINT-EGREVE, FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)			
 92-1234			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2 / 2

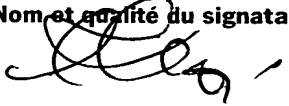
26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) 238065 D18426 EMP			
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		99 12317	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
Dispositif microfluidique.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
GENSET : 24, rue Royale, 75008 PARIS - FRANCE			
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33, rue de la Fédération, 75015 PARIS FRANCE			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		PEPONNET Christine	
Prénoms			
Adresse	Rue	5, Square des Sarcelles, 91250 TIGERY, FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)			
 92-1234			

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.:	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
↑ 35 à 42			RM	11/12/2000 par RRP	68 - 3 D NOV. 2001

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

## INTEGRATION DE PROTOCOLES BIOCHIMIQUES DANS UN DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE A FLUX CONTINU

5 La microfluidique consiste à utiliser des microcanaux au lieu de tubes à essais ou de microplaques pour réaliser des analyses et des réactions. Ces microcanaux ou microcircuits sont gravés dans du silicium, du quartz, du verre, des céramiques, ou du plastique. La taille des ces canaux est de l'ordre du micromètre alors que les volumes réactionnels sont de l'ordre du nanolitre ou du microlitre. Le principe est de faire cheminer  
10 les milieux réactionnels contenant des réactifs et des échantillons sur des zones correspondant aux différentes étapes du protocole. L'intégration de réacteurs, de colonnes chromatographiques, de systèmes d'électrophorèse capillaire et de systèmes de détection miniatures dans ces systèmes microfluidiques permet l'automatisation de protocoles complexes en les intégrant dans un système unique. Ces « laboratoires sur puce » ont  
15 permis d'obtenir des résultats performants en terme de vitesse de réaction, en terme d'économie de produits et en terme de miniaturisation permettant le développement d'appareils portables. Des résultats remarquables ont également été obtenus dans l'intégration et l'automatisation de protocoles complexes tels que les protocoles biochimiques ou de biologie moléculaire qui requièrent souvent de nombreuses  
20 manipulations. Ces manipulations comprennent notamment le mélange de réactifs et d'échantillons, le contrôle de la température réactionnelle, la réalisation de cyclages thermiques, la séparation par électrophorèse et la détection.

Wolley et al. (*Anal. Chem.*, 68, 4081-4086, 1996) décrivent ainsi l'intégration d'un microréacteur à PCR, d'un système d'électrophorèse capillaire et d'un détecteur dans un  
25 dispositif unique. La réaction de PCR, la séparation des produits par électrophorèse et leur détection sont réalisées de façon automatique. Ce dispositif n'intègre cependant pas le mélange des réactifs et il ne permet pas la réalisation de protocoles à grande échelle.

Un dispositif sur puce permettant l'intégration d'une étape de mélange des réactifs et d'une réaction enzymatique a été décrit par Hadd et al. (*Anal. Chem.*, 69, 3407-3412,  
30 1997). Ce dispositif prévoit un microcircuit de canaux et de réservoirs gravés dans un substrat en verre. Le déplacement et le mélange des fluides s'effectue par électrocinétique.

De nombreux systèmes microfluidiques pour l'intégration de protocoles et d'analyses ont ainsi été décrits notamment dans la demande de brevet internationale WO 98/45481. Une des grandes difficultés de mise en œuvre de ces dispositifs réside dans le

déplacement des fluides. Les fluides sont en général déplacés par électroosmose ou par électrocinétique, ce qui nécessite un réseau d'électrodes. D'autres systèmes font appel à des micropompes et des microvalves intégrées dans le substrat microfluidique. Dans la majorité des cas les réactions s'effectuent à l'arrêt dans un microréacteur puis les fluides sont ainsi déplacés d'un réacteur à un autre à chaque étape du protocole. Ces systèmes intégrant des électrodes, des microvalves ou des micropompes sont très coûteux et leur complexité ne permet pas des applications à grande échelle pour traiter simultanément un très grand nombre d'échantillons. Une des difficultés majeures est la distribution, le mélange et le transport d'un très grand nombre de produits en parallèle ou en série.

La présente invention a pour objet un dispositif comprenant un substrat microfluidique comportant au moins un microcanal dans lequel sont réalisées des réactions ou des successions de réactions composant un protocole. Le canal est alimenté en flux continu et des réactifs sont injectés successivement à différents stades du protocole. Le dispositif repose sur un système de distribution et de déplacement des fluides par pression hydrostatique. L'ensemble des étapes du protocole sont réalisées en flux continu, des injections séquentielles d'échantillons et de réactifs permettent de réaliser un grand nombre de réactions à la suite dans un même canal. En disposant plusieurs canaux en parallèle il est possible de réaliser un même protocole en série dans un même canal et en parallèle dans différents canaux. La synchronisation des réactions dans les canaux disposés en parallèle permet de distribuer les réactifs simultanément dans les différents canaux. Cette disposition trouve une application particulièrement avantageuse dans la rationalisation et la réduction du nombre de distributions à effectuer. L'association du substrat microfluidique avec un support thermique permet de contrôler la température réactionnelle dans les différentes zones du canal correspondant aux différentes étapes du protocole. L'invention concerne également des dispositifs et des procédés avantageux pour réaliser des cyclages thermiques en flux continu.

Le substrat microfluidique est de préférence semi-jetable (utilisé pour quelques centaines de réactions ou quelques dizaines d'heures) et rapporté de façon amovible sur le support thermique, les dispositifs d'alimentation en fluides et les moyens de détection. Le contrôle de la température, le déplacement des fluides, l'injection des réactifs, le mélange des solutions en flux continu et la détection sont entièrement automatisés. De plus la combinaison d'un dispositif fixe et d'un substrat microfluidique jetable mais peu coûteux permet une réduction importante des coûts par rapport à des systèmes dans lesquels tout est intégré sur la même puce.



### EXPOSE DE L'INVENTION

La présente invention a pour objet un dispositif comprenant un substrat microfluidique comportant au moins un microcanal dans lequel sont réalisées des réactions ou des successions de réactions composant un protocole.

Le dispositif d'analyse biochimique selon l'invention comprend un substrat microfluidique comportant au moins un canal possédant une cuvette d'alimentation pour injecter un échantillon et une cuvette de sortie pour recueillir ledit échantillon ; au moins un réservoir à réactif relié à chaque canal entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie ; et des moyens pour alimenter ledit canal en flux continu. Par cuvette d'alimentation et cuvette de sortie on entend tout type de réservoir, de raccord ou d'orifice à l'entrée et à la sortie du canal.

Le terme substrat microfluidique désigne un support solide dans lequel sont microfabriqués des canaux, des cuvettes ou des réservoirs. Le support solide peut être constitué d'un matériel polymère tel que le polyméthylmethacrylate (PPMA), le polycarbonate, le polytetrafluoroéthylène (Teflon™), le polyvinylchloride (PVC), le polydiméthylsiloxane (PDMS) et le polysulfone. Selon un autre mode de réalisation de l'invention le support solide est constitué de verre ou de quartz. Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention le substrat microfluidique est en silicium. Les techniques de microfabrication et de gravure du silicium sont bien connues par ailleurs permettant ainsi la fabrication de canaux aux dimensions et aux géométries bien définies. Ces techniques d'usinage du substrat silicium comprennent notamment les techniques de gravure chimique.

Le silicium présente également des avantages en raison de ces propriétés thermiques. Au contact d'une source thermique les temps de réponse du silicium sont ainsi très rapides.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention le substrat microfluidique comporte une pluralité de canaux disposés en parallèle, chaque cuvette d'alimentation étant respectivement reliée à une cuvette de sortie au moyen du canal. Typiquement plusieurs centaines de canaux sont disposés en parallèle sur un même substrat microfluidique. Un protocole donné peut donc être réalisé en parallèle dans chacun des canaux. Il est aussi possible de réaliser des protocoles différents dans chacun des canaux. Cependant pour faciliter notamment l'automatisation de l'injection des réactifs il est plus avantageux de réaliser le même protocole dans tous les canaux.

Le dispositif selon l'invention comporte des moyens pour alimenter au moins un canal en flux continu. Différentes méthodes ont été décrites pour déplacer des fluides dans

des substrats microfluidiques. Des techniques telles que l'électroosmose et l'électrophorèse sont ainsi très largement utilisés en microfluidique. Dans un mode de réalisation préféré de l'invention les moyens pour alimenter lesdits canaux en flux continu appliquent une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie.

5 L'injection des fluides (échantillons et réactifs) par force de pression permet un contrôle précis des débits. Le débit imposé par pression est indépendant de la composition des fluides. Alors que dans le cas de l'électrophorèse et de l'électroosmose la concentration en sel et la viscosité des solutions compliquent la maîtrise des débits. L'utilisation de la pression permet aussi d'utiliser des canaux de géométrie variable. En outre le contrôle des

10 fluides par pression ne repose pas sur un système complexe d'électrodes contrairement à l'électrophorèse et à l'électroosmose. Dans le dispositif selon l'invention, l'ensemble des moyens mis en œuvre pour l'injection des fluides dans le substrat microfluidique et pour le contrôle du débit des fluides sont de préférence indépendants du substrat microfluidique et rapportés de manière amovible sur celui-ci.

15 Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention le débit et l'injection de fluides dans la pluralité de canaux disposés en parallèle sont synchronisés. Cette synchronisation est nécessaire à l'automatisation et à l'intégration des différentes étapes du protocole. Par exemple les réactifs peuvent ainsi être injectés simultanément dans tous les canaux.

20 Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, les canaux sont alimentés en série avec des échantillons séparés les uns des autres par des « bouchons ». Ce « bouchon » séparant deux échantillons peut être constitué d'une solution tampon ou de réactifs ne contenant pas d'échantillon, de préférence ce « bouchon » est constitué d'un fluide inerte non miscible. Une multitude de réactions en série (ou séquentielles) peuvent

25 ainsi être réalisées « à la suite » dans un même canal du substrat microfluidique. A titre d'exemple le nombre d'échantillons injectés en série dans le canal est compris entre 1-100. Le dispositif selon l'invention permet ainsi de réaliser des protocoles à grande échelle sur un grand nombre d'échantillons puisque les échantillons sont traités à la fois en parallèle et en série.

30 De manière générale l'injection des échantillons et des réactifs dans le substrat microfluidique et le déplacement des fluides en flux continu sont obtenus soit en appliquant une pression positive en entrée soit en appliquant une pression négative en sortie. Tout dispositif permettant d'appliquer une telle pression est utilisable, de tels dispositifs sont connus par ailleurs.

L'amenée des échantillons à analyser et la mise en place des réactifs dans les réservoirs peut avoir lieu par micro-pipetage.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention les injections de fluide dans le substrat microfluidique sont réalisées par injection pneumatique. Les échantillons ou les réactifs sont déposés dans des réservoirs reliés à au moins un canal. L'injection dans les canaux s'effectue par application d'une pression d'un gaz ou d'un liquide incompressible non miscible sur le réservoir. Un tel système d'injection pneumatique peut être utilisé pour imposer un débit précis sur l'ensemble des canaux.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention des systèmes des pousses- seringues disposés en parallèle permettent de réguler les débits dans les canaux. Ces pousses-seringues peuvent être placés soit en entrée soit en sortie du canal.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'amenée des fluides est réalisée avec un dispositif d'injection tel que décrit dans la demande de brevet « Dispositif d'injection de fluides dans un microsystème microfluidique » No.

L'amenée des fluides sur le substrat microfluidique peut être obtenue par une combinaison des modes décrits précédemment. Pour des substrats microfluidiques avec un grand nombre de canaux l'amenée des fluides peut être automatisée au moyen d'un robot de distribution ou de dispense à haute résolution. Par ailleurs les injections en série ou séquentielles supposant le remplacement dans le temps d'au moins une solution par une autre peuvent être automatisées par l'introduction séquentielle dans le réservoir correspondant de plusieurs solutions distinctes. Entre deux solutions un tampon neutre non miscible peut être introduit dans le réservoir.

Le contrôle précis de la température réactionnelle est un élément déterminant dans la réalisation de protocoles chimiques, biochimiques et biologiques.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention le dispositif comprend au moins un support thermique présentant une face d'échange thermique en contact avec au moins une face du substrat microfluidique de sorte que l'échantillon parcourant le canal est porté à une température déterminée. Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention le substrat microfluidique est rapporté de façon amovible sur le support thermique. Dans la réalisation de protocoles complexes, il est souvent indispensable de réaliser différentes étapes ou réactions à des températures distinctes prédéterminées. Le contrôle de la température réactionnelle est particulièrement important pour les réactions enzymatiques qui doivent être effectués à des températures précises. Le dispositif selon l'invention

permet de réaliser des protocoles comportant différentes étapes à différentes températures fixes ainsi que des protocoles comportant des étapes de cyclage thermique. La capacité d'effectuer de tels cycles de température est notamment primordiale pour toutes les réactions d'amplification d'acides nucléiques.

5 Le support thermique présente une face d'échange thermique en contact avec une face du substrat microfluidique au voisinage de laquelle se trouvent les canaux. De préférence la face du substrat microfluidique en contact avec le support thermique présente une paroi mince. De façon plus précise, la paroi est choisie suffisamment mince pour permettre un échange thermique avec le support thermique externe au substrat  
10 microfluidique. En particulier, la paroi séparant les canaux du support thermique peut être choisie plus mince qu'une paroi séparant les canaux entre eux ou des réservoirs. Selon un autre aspect de l'invention, la face des canaux opposée à la paroi mince peut présenter une barrière thermique, celle-ci pouvant être réalisée par une couche de matériau peu conducteur thermique et/ou une structuration du substrat permettant de localiser sur les  
15 canaux une cavité remplie d'air ou d'un gaz peu caloporteur. Cette barrière thermique permet d'uniformiser la température dans les canaux.

Le support thermique comporte au moins une zone thermostatée mais il peut aussi comporter plusieurs zones thermostatées portées à des températures différentes. Les différentes zones thermostatées sont disposées de façon à coïncider avec des portions de  
20 canaux du support d'analyse. Ces zones thermostatées définissent des zones dans lesquelles se réalise une étape spécifique du protocole. Les zones thermostatées coïncident par exemple avec au moins une zone du substrat microfluidique située en aval d'un raccord entre un réservoir à réactif et un canal. En associant par exemple une zone thermostatée du support thermique avec une zone correspondante du substrat  
25 microfluidique par exemple en aval de chaque réservoir à réactif, il est possible de contrôler et d'adapter sélectivement la température du mélange réactionnel circulant dans le canal en fonction de chaque réactif utilisé et en fonction de la réaction effectuée. Le terme aval utilisé ici s'entend par rapport à la direction d'écoulement des échantillons depuis la cuvette d'alimentation jusqu'à la cuvette de sortie. Dans un mode de réalisation  
30 de l'invention le support thermique comporte au moins deux zones thermostatées à des températures différentes agencées de sorte que l'échantillon parcourant le canal est porté successivement à au moins deux températures prédéterminées. La température peut être régulée en utilisant différentes zones thermostatées à température constante ou en faisant

varier la température de la zone thermostatée. Le mélange réactionnel parcourant le canal est ainsi porté successivement aux différentes températures requises.

On prévoit également selon l'invention un dispositif comprenant au moins une zone thermostatée portée à au moins deux températures distinctes de sorte que l'échantillon parcourant une fois cette zone est porté à au moins deux températures prédéterminées.

Alternativement le dispositif selon l'invention comprend au moins une zone thermostatée portée à au moins deux températures distinctes suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé de telle sorte que l'échantillon subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée. De manière préférée, la partie du canal traversant la zone thermostatée est rectiligne.

Différents systèmes peuvent être envisagés pour le support thermique et les zones thermostatées. Dans un premier mode de réalisation de l'invention des éléments à effet Peltier sont utilisés pour le support thermique. Ces éléments à effet Peltier sont connus par ailleurs. Des jonctions de métaux différents traversés par un courant électrique permettent de refroidir ou de chauffer une surface réduite. Une sonde de température sur l'élément Peltier permet de réguler la puissance qui est proportionnelle à l'intensité électrique et donc permet de réguler la température. A titre alternatif ou complémentaire le support thermique peut comporter également un ou plusieurs canaux traversés par un fluide caloporteur. Ce fluide peut être utilisé pour chauffer ou refroidir localement le support d'analyse.

Préférentiellement, les moyens de chauffage ainsi que les moyens d'injection et de contrôle de fluides ne sont pas intégrés dans le substrat microfluidique. Le substrat microfluidique est rapporté de façon amovible sur ces éléments de chauffage et d'injection de fluides. Cette caractéristique permet de réduire par conséquent dans des proportions importantes le coût du substrat microfluidique. Ainsi ce support peut être du type à utilisation unique ou à utilisations multiples, c'est à dire être jeté après une ou plusieurs utilisations. On entend par utilisation la réalisation d'un protocole à grande échelle en série et en parallèle sur les canaux du substrat microfluidique.

Dans un aspect particulièrement avantageux de l'invention, le dispositif conforme à l'invention comporte des moyens de détection pour mesurer une caractéristique physico-chimique des échantillons parcourant les canaux. De préférence, ces moyens de détection sont localisés au niveau des cuvettes de sortie desdits canaux. Dans un autre mode de réalisation les moyens de détection sont localisés directement au niveau des canaux et la détection est réalisée en flux continu.

Avantageusement, l'injection des échantillons, l'addition de réactifs, le mélange des solutions, la régulation de la température réactionnelle et la détection sont automatisables dans le dispositif selon l'invention. Le dispositif selon l'invention est donc un système totalement intégré dans lequel les interventions manuelles sont réduites. Différents protocoles peuvent ainsi être totalement intégrés dans le dispositif à flux continu selon l'invention.

L'invention se rapporte aussi à l'intégration de protocoles complexes dans un dispositif microfluidique à flux continu et à la réalisation de protocoles en flux continu.

On prévoit selon l'invention un procédé pour la réalisation de protocoles biochimiques sur au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution contenant au moins un échantillon en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal,
- b) on injecte au moins un réactif à partir d'au moins un réservoir à réactif dans ledit canal de manière à mélanger ledit échantillon et ledit réactif.

L'échantillon peut ensuite être prélevé dans la cuvette de sortie dudit canal.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention le procédé pour la réalisation de protocoles biochimiques sur au moins un échantillon est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution contenant au moins un échantillon en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal,
- b) on injecte au moins un réactif à partir d'au moins un réservoir à réactif dans ledit canal de manière à mélanger ledit échantillon et ledit réactif,
- c) on détecte au moins un paramètre physico-chimique dudit échantillon dans ledit canal.

Les procédés conformes à l'invention pourront en outre présenter au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- la solution parcourt au moins une zone thermostatée de sorte que la solution est mise à une température déterminée lorsqu'elle parcourt ladite zone thermostatée;
- la solution parcourt au moins une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées de sorte que la solution est mise successivement aux dites températures lorsqu'elle parcourt une fois ladite zone thermostatée ;
- la solution parcourt une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle

prédéterminé de telle sorte que la solution subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée ;

- la solution subit de 1-35 fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.

5 Le contrôle de la température et la réalisation de cyclages thermiques sont des éléments essentiels pour toutes les réactions enzymatiques et notamment pour les réactions d'amplification d'acides nucléiques. Les procédés conformes à l'invention permettent d'intégrer le mélange des échantillons et des réactifs ainsi que les différents traitements thermiques et ne nécessitent pas de manipulations.

10 Pour réaliser des protocoles à très grande échelle les procédés conformes à l'invention comprendront de préférence une des étapes suivantes :

- on alimente séquentiellement le canal avec une pluralité d'échantillons séparés les uns des autres par des bouchons constitués d'un fluide inerte non miscible ;

- les différentes étapes du procédé sont réalisées simultanément sur une pluralité de  
15 canaux disposés en parallèle.

Les procédés conformes à l'invention sont également très avantageux pour toutes les réactions impliquant un cyclage de température.

En vue de la réalisation de tels protocoles on prévoit selon l'invention un procédé pour la réalisation en flux continu d'au moins un cycle de température sur une solution  
20 contenant au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) on alimente un canal en flux continu avec ladite solution contenant au moins un échantillon,

b) on fait parcourir à ladite solution une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées suivant une succession temporelle formant un  
25 cycle prédéterminé de telle sorte que la solution subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention on prévoit un procédé pour la réalisation en flux continu d'au moins un cycle de température sur une solution contenant au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

30 a) on alimente un canal en flux continu avec ladite solution,

b) on fait parcourir à ladite solution une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé de telle sorte que la solution subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.

- c) on détecte au moins un paramètre physico-chimique dudit échantillon en aval dudit canal.

De préférence, on peut prévoir que le canal est alimenté en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.

De préférence on peut prévoir que la solution subit de 1-35 fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.

Pour réaliser des protocoles de cyclage thermique à très grande échelle les procédés conformes à l'invention comprendront de préférence une des étapes suivantes :

- 10 - on alimente séquentiellement le canal avec une pluralité d'échantillons séparés les uns des autres par des bouchons;
- les différentes étapes du procédé sont réalisées simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

Les procédés conformes à l'invention sont également très avantageux pour toutes les techniques d'amplification d'acides nucléiques.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le procédé pour l'amplification d'acides nucléiques conforme à l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on mélange ledit acide nucléique avec des réactifs appropriés pour l'amplification d'acides nucléiques,
- b) on alimente un canal en flux continu avec le mélange réactionnel,
- c) on fait parcourir à ce mélange réactionnel une zone thermostatée portée successivement à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé,
- 25 d) on choisit les températures et la durée du cycle de température de la zone thermostatée ainsi que le temps mis par le mélange pour parcourir la zone thermostatée de telle sorte que l'acide nucléique subit plusieurs fois le cycle dénaturation-hybridation-élongation.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le procédé pour l'amplification d'acides nucléiques conforme à l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution comprenant ledit acide nucléique,



- b) on injecte au moins un réactif approprié pour l'amplification d'acides nucléiques à partir d'au moins un réservoir à réactif dans ledit canal de manière à mélanger ledit acide nucléique et ledit réactif,
  - c) on fait parcourir à ce mélange réactionnel une zone thermostatée portée successivement à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé,
  - d) on choisit les températures et la durée du cycle de température de la zone thermostatée ainsi que le temps mis par le mélange pour parcourir la zone thermostatée de telle sorte que l'acide nucléique subit plusieurs fois le cycle dénaturation-hybridation-élongation.
- 10 Les procédés conformes à l'invention pourront en outre présenter au moins l'une des caractéristiques suivantes :
- on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.
  - le canal est formé dans un substrat en silicium.
  - 15 - on alimente séquentiellement ledit canal avec une pluralité d'acides nucléiques séparés les uns des autres par des bouchons.
  - les étapes a), b), c) et d) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

20 Les procédés et les dispositifs conformes à l'invention permettent d'intégrer en flux continu des protocoles de génotypage à grande échelle et notamment des protocoles de microséquençage .

En vue de la détection en flux continu d'au moins un nucléotide dans au moins un acide nucléique cible, on prévoit un procédé caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 25 a) on alimente un canal en flux continu avec une solution comprenant ledit acide nucléique ;
- b) on injecte le réactif de microséquençage comprenant le tampon de microséquençage, l'amorce de microséquençage, au moins un ddNTP et une polymérase, dans ledit canal de manière à mélanger ledit acide nucléique et ledit réactif;
- 30 c) on fait parcourir à la solution au moins une zone thermostatée de façon à obtenir au moins un cycle comprenant la dénaturation de l'acide nucléique cible, l'hybridation dudit acide nucléique avec l'amorce de microséquençage et l'incorporation du ddNTP, complémentaire au nucléotide à détecter, à l'extrémité 3' de ladite amorce ;

d) on détecte au moins un ddNTP incorporé à l'extrémité 3' de l'amorce de  
microséquençage.

Optionnellement ce procédé de microséquençage conforme à l'invention peut comprendre au moins une des étapes ou suivantes :

- 5 - on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.
- la zone thermostatée est portée successivement à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant au moins un cycle.
- les ddNTPs sont marqués avec des fluorophores et à l'étape d) on détecte la  
10 fluorescence du ddNTP incorporé.
- les étapes a), b), c) et d) sont réalisées simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

Avantageusement le protocole de microséquençage est précédé d'une réaction d'amplification et d'une réaction de purification du produit d'amplification. Toutes ces  
15 étapes réactionnelles sont intégrées dans le même dispositif microfluidique conforme à l'invention.

Le procédé pour la détection en flux continu d'au moins un nucléotide dans au moins un acide nucléique cible est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution contenant au moins un acide  
20 nucléique cible ;
- b) on injecte le réactif pour l'amplification de la région de l'acide nucléique cible portant au moins un nucléotide à détecter, dans ledit canal à partir d'un premier réservoir à réactif;
- c) on fait parcourir à la solution au moins une zone thermostatée de telle sorte que l'acide  
25 nucléique subit plusieurs fois le cycle dénaturation-hybridation-élongation;
- d) on injecte le réactif pour la purification du produit d'amplification dans ledit canal à partir d'un deuxième réservoir à réactif;
- e) on fait parcourir à la solution au moins une zone thermostatée pour réaliser la réaction de purification ;
- 30 f) on injecte le réactif de microséquençage comprenant le tampon de microséquençage, l'amorce de microséquençage, au moins un ddNTP et une polymérase, dans ledit canal à partir d'un troisième réservoir à réactif;
- g) on fait parcourir au mélange réactionnel au moins une zone thermostatée de façon à obtenir au moins un cycle comprenant la dénaturation de l'acide nucléique cible,

l'hybridation dudit acide nucléique avec l'amorce de microséquençage et l'incorporation du ddNTP, complémentaire au nucléotide à détecter, à l'extrémité 3' de ladite amorce ;

- h) on détecte au moins un ddNTP incorporé à l'extrémité 3' de l'amorce de microséquençage.

Le procédé conforme à l'invention peut en outre comporter les étapes suivantes :

- on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.
- aux étapes c) et e) la zone thermostatée est portée successivement à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant au moins un cycle.
- les ddNTPs sont marqués avec des fluorophores et dans lequel à l'étape h) on détecte la fluorescence du ddNTP incorporé.
- le réactif pour la purification comprend une exonucléase et une alcaline phosphatase.
- les étapes a), b), c), d), e), f), g) et h) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

Un autre aspect particulièrement avantageux de l'invention est la miniaturisation des volumes réactionnels. Typiquement les volumes réactionnels sont de l'ordre de 0,1 µl à 10 µl. Dans un mode de réalisation préféré de l'invention les volumes réactionnels sont de l'ordre de l'ordre de 0,5 µl à 5 µl. De préférence le volume de l'échantillon initial est de 1-2 µl.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description de modes préférés de réalisation donnés à titre d'exemple et non limitatifs.

### **Description détaillée de modes de mise en œuvre de l'invention**

Dans la description qui suit des parties identiques, similaires, ou équivalentes des figures sont repérées avec les mêmes références numériques afin d'en faciliter la lecture.

#### **Substrat microfluidique**

La figure 1 est une coupe d'un substrat microfluidique 100 conforme à l'invention. Sur cette figure est représentée une cuvette d'entrée 102 formée pour l'essentiel par une ouverture traversante pratiquée dans un substrat 100a, au voisinage de l'une de ces extrémités. De la même façon, une cuvette de sortie 104 est pratiquée au voisinage d'une deuxième extrémité. Les cuvettes 102, 104 débouchent en une première face 106 du substrat 100. Un canal interne 108 relie les cuvettes d'entrée et de sortie.

Le canal 108 se présente sous la forme d'une rainure gravée dans un second substrat 100b collé au premier substrat de sorte que ce dernier recouvre la rainure.

On observe que la profondeur de la rainure est pratiquement égale à l'épaisseur du deuxième substrat 100b, de sorte que seule une mince paroi 110 sépare le canal 108 d'une deuxième face 112 du substrat microfluidique 100.

Dans l'exemple illustré, le substrat 100 est de forme générale parallélépipédique et les première et deuxième faces sont les faces principales opposées et parallèles. La figure représente également en coupe des réservoirs de réactif 120a, 120b, 120c agencés entre les cuvettes d'entrée ou d'alimentation 102 et de sortie 104. Les réservoirs débouchent également sur la première face 106 du support d'analyse 100. Des raccords ou passages 122a sont prévus pour relier chacun des réservoirs au canal 108.

Pour des raisons de simplification, les passages 122a sont représentés dans le plan de la figure, de sorte que les réservoirs ne se distinguent pas des cuvettes d'alimentation et de sortie sur la figure 1.

## 15 **Systèmes d'alimentation en fluides**

La figure 1B montre un substrat microfluidique conforme à la figure 1A dont les réservoirs 120a, 120b et 120c sont respectivement associés à des moyens d'amenée de fluide 150a, 150b et 150c.

Ces moyens comportent des bouchons, ou capuchons d'alimentation 152a, 152b, 152c appliqués de façon étanche au-dessus des réservoirs et reliés à des pousse-seringues 154 a, 154b et 154c qui contiennent des réactifs. Les capuchons peuvent être collés à la surface du substrat microfluidique ou serrés contre la surface en utilisant un joint d'étanchéité.

Les références 156a, 156b et 156 c désignent respectivement des capteurs de pression ménagés sur des conduites reliant les pousse-seringues aux capuchons 152a, 152b et 152c de façon à contrôler la pression et/ou le débit des réactifs.

Bien que non représenté, un système d'alimentation semblable peut également équiper les cuvettes d'alimentation ou d'entrée.

Comme le montrent les figures 1A et 1B, les cuvettes d'entrée et les réservoirs sont soumis à la pression atmosphérique, ou à une pression fixée par le système d'alimentation, tandis qu'une ligne à vide 124 est appliquée aux cuvettes de sortie. La figure 2 montre de façon plus précise et de façon séparée les deux substrats 100a et 100b qui forment le substrat microfluidique.

On observe que le substrat microfluidique comporte une pluralité de cuvettes d'alimentation 102 et une pluralité de cuvettes de sortie 104.

Les cuvettes ont la forme d'ouvertures traversantes pratiquées dans le premier substrat 100a. Ces ouvertures présentent une forme évasée en V, formant un entonnoir.

5 Par ailleurs dans l'exemple de la figure 2, chaque cuvette d'entrée 102 est individuellement reliée à une cuvette de sortie 104 par un canal 108. Le substrat microfluidique comprend trois réservoirs à réactif 120a, 120b, 120c. Dans cet exemple, chaque réservoir est commun à plusieurs canaux 108 auxquels il est relié au moyen de raccords 122a, 122b. La référence 122a désigne plus précisément des perçages du premier substrat 110a reliant un

10 réservoir à des embranchements 122b correspondants, pratiqués dans le deuxième substrat 110b et connectés respectivement aux canaux. Bien entendu, des réservoirs peuvent également être individualisés pour les différents canaux.

Les quantités de fluide (échantillons et réactifs) qui se mélangent au croisement des embranchements 122b et des canaux 108 dépendent de la taille respective de ces

15 embranchements et des canaux 108.

### **Support thermique**

La figure 3 montre un substrat microfluidique 100, conforme à celui de la figure 2, dont les substrats 100a et 100b sont définitivement collés. Le substrat microfluidique est représenté au-dessus d'un support thermique 200 correspondant.

20 Le support thermique 200 présente une face d'échange thermique 212 tournée vers la deuxième face 112 du substrat microfluidique 100, au voisinage de laquelle se trouvent les canaux. La face d'échange thermique 212 présente trois zones thermostatées 220a, 220b, 220c équipées chacune d'une ou plusieurs sources thermiques (non représentées).

Les trois zones thermostatées 220a, 220b, 220c sont disposées de façon à coïncider

25 avec des portions de canaux du substrat microfluidique situés au voisinage respectivement des réservoirs 120a, 120b, 120c, ou plus précisément des embranchements apportant les réactifs.

La figure 4 et 5 présentent deux variantes de réalisation du dispositif permettant d'améliorer l'uniformité de la température dans les canaux en isolant leur face supérieure,

30 c'est à dire la face opposée à ladite deuxième face 112 du substrat microfluidique. Une première solution représentée à la figure 6 consiste à réaliser dans la partie supérieure 110a du support une cavité 160 (débouchante ou non). Cette cavité coïncide avec au moins une partie du canal 108. Une seconde solution représentée à la figure 5 consiste à mettre en

place entre les parties supérieure et inférieure 100a, 100b du substrat microfluidique une couche 100c de matériau isolant thermique.

### **Procédés de fabrication d'un substrat microfluidique**

Dans une réalisation particulière du substrat microfluidique, celui-ci peut comporter un premier substrat présentant des ouvertures traversantes qui forment respectivement les cuvettes, les raccords et les réservoirs et un deuxième substrat, collé au premier substrat présentant des rainures, recouvertes par le premier substrat pour former des canaux et coïncidant respectivement avec les ouvertures traversantes. Cette structure particulièrement simple permet de réduire les coûts de fabrication des substrats microfluidiques. La fabrication du substrat microfluidique peut avoir lieu, conformément à l'invention, selon un procédé comprenant les étapes successives suivantes :

- formation, dans un premier substrat, d'ouvertures traversantes, lesdites ouvertures correspondant respectivement à des cuvettes d'alimentation ou à des cuvettes de sortie, ou à des réservoirs de réactif,
- formation dans un deuxième substrat de rainures selon un motif permettant de relier entre elles au moins deux ouvertures du premier substrat,
- collage du premier substrat sur le deuxième substrat de façon à recouvrir les rainures,
- amincissement du deuxième substrat, après le collage, en préservant une épaisseur de substrat supérieure à une profondeur maximale des rainures.

Les figures 6 à 9, décrites ci-après donnent un exemple de procédé de réalisation d'un substrat microfluidique tel que décrit précédemment.

Dans une première plaque de substrat 110a, par exemple en silicium, on pratique, comme le montre la figure 6, des ouvertures traversantes. Ces ouvertures traversantes constituent les cuvettes ou les réservoirs 102, 104, 120a, 120b, 120c. Les ouvertures gravées par voie chimique sont réalisées avec des flancs inclinés par gravure chimique anisotrope par exemple (KOH) de façon à leur conférer une forme évasée. L'emplacement des ouvertures est défini par un masque de gravure (non représenté) en coïncidence avec le motif des rainures. Le perçage de la couche 100c de matériau isolant thermique, par exemple  $\text{SiO}_2$  dans le cas de la variante proposée figure 5, peut être effectué, par exemple, par gravure  $\text{CHF}_3$  par voie sèche, la dimension de la perforation étant définie par un masque de gravure ou en utilisant les parois du trou créé par voie chimique comme masque.

La figure 7 montre la gravure de rainures formant les canaux 108, dans un deuxième substrat 100b par exemple de silicium. La gravure est effectuée à travers un

masque de gravure (non représenté) présentant un motif correspondant aux canaux souhaités. Il s'agit par exemple, d'une gravure chimique (KOH). La profondeur des rainures est par exemple de l'ordre de 100µm pour un substrat 100b d'une épaisseur de 250 à 450µm.

5 Il peut s'agir aussi d'une gravure sèche SG6 permettant de réaliser des rainures plus profondes que larges par exemple 100µmx20µm.

Une troisième étape représentée à la figure 8 comprend le scellement des premiers et deuxième substrats 100a et 100b, de manière à mettre en communication les cuvettes ou réservoirs 102, 104, 120a, 120b, 120c, avec les canaux (rainures) 108 correspondants. Le  
10 scellement a lieu, par exemple, par collage direct (moléculaire) des deux substrats.

Lors de cette opération, les rainures 108 du deuxième substrat 100b sont recouvertes par le premier substrat 100a pour former les canaux.

Une dernière étape, représentée à la figure 9, comprend l'amincissement du deuxième substrat 100b de façon à ne préserver entre le canal 108 et la surface extérieure  
15 112 qu'une mince paroi 110.

Cette paroi 110 présente une épaisseur de l'ordre de 10µm de façon à favoriser les échanges thermiques. L'amincissement est réalisé par gravure et/ou par polissage mécano-chimique.

Une pluralité de substrats microfluidiques conformes à l'invention peuvent être  
20 fabriqués simultanément et collectivement selon le procédé ci-dessus dans deux tranches de silicium (correspondant aux premier et deuxième substrat). Dans ce cas, le procédé est complété par un découpage des tranches à la scie pour individualiser les substrats microfluidiques.

## 25 **Dispositifs et procédés pour la réalisation de protocoles biochimiques par cyclage thermique**

Les dispositifs et procédés conformes à l'invention permettent de réaliser en flux continu des protocoles biochimiques incluant une étape par cyclage thermique. La présente invention se rapporte entre autres à la réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR), largement utilisée en analyse génétique. L'invention qui est utilisable en analyse  
30 génétique est cependant également utilisable pour de nombreux protocoles dans le domaine de la biochimie et de la biologie moléculaire.

On fera d'abord de brefs rappels sur les propriétés physico-chimiques de l'ADN puis nous présenterons un élément d'art antérieur concernant un dispositif pour réaliser la PCR.

L'ADN est une macromolécule composée d'un enchaînement de quatre nucléotides différents (A, C, G, T). Les quatre nucléotides sont capables de s'apparier deux à deux (A:T et G:C). On parle de complémentarité. Deux brins complémentaires sont capables de s'hybrider et de se séparer successivement à l'infini. L'état double ou simple brin dépend des conditions de stringence (pH, sel, température). C'est cette capacité d'hybridation et de dénaturation successives qui est utilisée au cours de la réaction de PCR (réaction de polymérisation en chaîne).

Dans la nature, lors de la division cellulaire, l'ADN est dupliqué de façon à assurer la transmission de l'information génétique. La synthèse de cet ADN est assurée par des enzymes. Il s'agit des ADN polymérases. A partir d'un brin d'ADN matrice, elles incorporent en face de chaque nucléotide celui qui lui est complémentaire, créant ainsi un nouveau brin d'ADN. C'est l'élongation.

In vitro, pour réaliser cette synthèse, il faut fournir à la polymérase en plus de la matrice et des dNTP, une amorce qui permettra d'initier la polymérisation. Cette amorce est un court fragment d'ADN (une vingtaine de nucléotides environ) complémentaire d'une extrémité du fragment d'ADN matrice. Pour obtenir de l'ADN double brin, il faut deux amorces : une sur chaque brin, de part et d'autre du fragment que l'on veut amplifier.

En vue de reproduire un ADN en de multiples exemplaires, la PCR exploite les capacités de dénaturation et d'hybridation de l'ADN ainsi que l'élongation par une polymérase. Le principe est le suivant :

- dénaturation de l'ADN par chauffage de la solution à 94°C, de façon à séparer complètement les deux brins d'ADN et à éliminer les structures secondaires ;
- hybridation de l'amorce sur le simple brin en abaissant la température afin de permettre l'appariement spécifique ; et
- élongation d'un brin d'ADN en se plaçant à la température optimale d'activité de la polymérase thermostable, soit 72°C.

Après ces trois étapes qui constituent un cycle, on dénature à nouveau : l'ADN néosynthétisé va servir à son tour de matrice. Les cycles sont ainsi répétés vingt à trente fois. L'augmentation de la quantité de matrice est exponentielle.

Il existe, en analyse génétique, d'autres protocoles nécessitant des cyclages en température : ainsi on connaît des techniques d'amplification dérivées de la PCR (Polymerase Chain Reaction) telles que la RT-PCR, la PCR allèle spécifique, et la Taq Man PCR (White B.A., 1997). On connaît également des techniques de LCR (Ligase Chain Reaction) comme la LCR, la Gap LCR, Asymetric Gap LCR, la RT-LCR,



l'Oligonucleotide Ligation Assay (OLA), et la PCR-OLA (Bouma, S.R., 1993), (Segev, D., 1990), (Nikiforov, T., 1995), (Marshall, R.L., 1994), Nickerson, D.A. et al., 1990). On connaît des réactions de séquençage cyclique à partir de clones ou de réactions de PCR. On connaît des réactions de microséquençage cyclique (single nucleotide primer extension)  
 5 (Cohen, D., 1996).

Toutes ces techniques sont concernées par l'invention dans la mesure où elles impliquent un cyclage en température.

Différents dispositifs ont été conçus pour mettre en œuvre les protocoles biologiques incluant des étapes de cycles thermiques.

10 Dans un type de dispositif connu, l'échantillon biologique est placé dans un réservoir qui est porté successivement aux températures requises pour obtenir les traitements thermiques désirés. Certains dispositifs utilisent un système de thermostatisation par effet Peltier. Le temps de réponse thermique de ces dispositifs est de l'ordre de 3°C/s. La méthode utilisée par ces dispositifs est simple à mettre en œuvre  
 15 mais il en résulte des temps de cycle très longs pour réaliser l'ensemble du protocole. Cette solution ne permet pas d'augmenter les vitesses des réactions.

D'autres techniques utilisent un réservoir gravé dans un substrat de silicium. Le chauffage du réservoir est obtenu par une résistance électrique formée par un dépôt de platine. Le refroidissement du réservoir est obtenu par conduction permanente sur une  
 20 plaque froide. Pour améliorer le temps de réponse thermique lors des cycles de température, le réservoir (ou chambre de réaction) est suspendu par des poutres en silicium réalisées par gravure chimique dans le substrat. Le temps de réponse thermique est supérieur à la dizaine de degrés par seconde. La technique utilisée est cependant difficilement compatible l'intégration des protocoles dans un « laboratoire sur puce » c'est  
 25 à dire dans un substrat microfluidique où le principe est de faire circuler des liquides entre différentes réactions biologiques ou biochimiques. En particulier, il n'est pas possible de travailler en flux continu et donc d'intégrer un protocole à grande échelle.

Dans un autre type de dispositif connu des micro-canaux permettant de faire circuler des fluides biologiques sont micro-usinés sur un substrat de silicium, de verre ou  
 30 de matériau polymère. Ces micro-canaux ou capillaires permettent de faire circuler en permanence des échantillons. Le fluide traverse successivement des zones à températures fixées suivant les traitements thermiques nécessaires. Cette solution conduit à réaliser les microcanaux sous forme de serpents.

La figure 10 illustre un dispositif de ce type. Il s'agit d'une vue de dessus d'un substrat dans lequel un micro-canal 1, représenté de manière figurée, a été formé. Le micro-canal 1 forme un serpentín entre un orifice d'entrée 2 et un orifice de sortie 3. Les références 4, 5 et 6 représentent des zones soumises à des températures  $T_1$ ,  $T_2$  et  $T_3$  respectivement. Le serpentín comporte des sections actives dans lesquelles le fluide à traiter subit le cycle dénaturation-hybridation-élongation, ces sections actives alternent avec des sections passives servant à ramener le fluide dans la zone à température de dénaturation.

Un inconvénient majeur de cette disposition est qu'elle impose des limites rédhibitoires à la miniaturisation. En effet, il est nécessaire de disposer d'autant de zones thermiques qu'il y a de températures différentes dans un cycle thermique. De plus, chaque zone thermique doit être séparée d'une distance suffisante d'une autre zone thermique afin de garantir une température uniforme dans les zones isothermes. Un autre obstacle à la miniaturisation est dû au nombre de boucles du serpentín qui correspond au nombre de cycles thermiques désirés. La miniaturisation implique une diminution de la largeur des canaux, ce qui pose des problèmes fluidiques (risque de bouchage, pertes de charge). De plus, à débit de liquide imposé, les vitesses d'écoulement deviennent importantes, ce qui oblige à augmenter les dimensions des zones thermiques. En effet, la longueur d'une zone de chauffe doit être égale au temps de la réaction multiplié par la vitesse du liquide.

Le document GB-A-2 325 464 divulgue encore un autre type de dispositif. Dans ce dispositif, la chambre de réaction comporte une pluralité de microcanaux parallèles, ayant une entrée et une sortie communes. Le fluide à traiter passe dans la chambre de réaction et est soumis à trois températures différentes, soit dans trois zones séparées, soit dans une même zone. Le dispositif n'est pas conçu pour travailler en flux continu puisque le fluide est maintenu à l'arrêt durant les étapes du procédé. Au mieux la circulation du fluide peut être reprise pendant l'étape d'élongation. Cette solution implique des moyens séquentiels de mise en circulation du fluide assez complexes et qui doivent être parfaitement coordonnés avec les cycles de température.

On connaît par ailleurs du document US-5 736 314 un dispositif permettant de mettre en œuvre la PCR. La solution parcourt un tube entouré d'éléments chauffants annulaires. Chaque élément chauffe à une température donnée le tronçon de tube qu'il entoure. A mesure qu'elle parcourt le tube, la solution est donc soumise à différentes températures successives qui, convenablement choisies, permettent de mettre en œuvre la PCR. Ce dispositif a pour inconvénient qu'il requiert d'avoir autant de zones thermiques

qu'il y a de températures différentes dans un cycle et qu'il y a de cycles. Cela rend le circuit de la solution particulièrement long. De plus, chaque zone thermique doit être isolée le mieux possible des zones adjacentes pour garantir autant que possible une température uniforme dans chaque zone. Or, cela est difficile à réaliser en pratique et/ou très coûteux.

5 De plus, cela allonge également le circuit.

Aucun des dispositifs de l'art antérieur ne permet de traiter un échantillon par un protocole thermique à flux continu et en ayant le meilleur compromis entre les paramètres suivants:

- surface active minimale pour le dispositif,
- 10 - débit de substance traitée maximum (volume de réaction par unité de temps),
- section de canal maximale pour une surface interne des canaux minimale.

Un but de l'invention est de fournir un dispositif de cyclage thermique permettant de réduire la longueur du circuit de la solution et d'obtenir à faible coût les températures exactement requises pour le cyclage thermique.

15 En vue de la réalisation de ce but, on prévoit selon l'invention un dispositif pour la réalisation de réactions chimiques ou biochimiques par cyclage thermique, comportant au moins un canal, des moyens pour alimenter en continu le canal avec une solution et des moyens pour donner au canal au moins deux températures prédéterminées de sorte que la solution est mise à ces températures lorsqu'elle parcourt une fois le canal, le dispositif

20 comportant des moyens pour faire passer le canal de l'une à l'autre des températures au cours du temps durant le parcours du canal par la solution.

Ainsi, toute la solution circulant dans le canal (ou dans le tronçon de canal considéré) est portée successivement aux différentes températures requises par le cyclage thermique. En choisissant la vitesse de parcours, on détermine donc le nombre de fois où la

25 solution subit ce cyclage dans le canal. Le nombre de cycles sera d'autant plus élevé que la vitesse de parcours de la solution sera basse.

L'invention permet de réduire les dimensions du dispositif, ce qui réduit le coût de réalisation. L'utilisation d'une seule zone thermique pour le canal supprime les difficultés apparaissant dans l'art antérieur avec les zones thermiques voisines à températures

30 différentes. L'invention permet de donner au canal une configuration linéaire, ce qui est facile, et donc peu coûteux, à fabriquer. Il est très avantageux de supprimer les virages et de diminuer la longueur des canaux notamment quand le fluide circule par effet électro-osmotique. L'invention limite les risques de contamination entre différents protocoles successifs et facilite les rinçages et les nettoyages. Les temps des différentes étapes des

cycles peuvent être facilement modifiés sans changer ni la microstructure, ni le mode de thermostatisation, mais uniquement le débit du fluide à traiter. Des débits très lents peuvent être utilisés puisque la longueur du circuit peut être petite. Ceci apporte beaucoup d'avantages, notamment lorsque le liquide est déplacé par pression car les pertes de charge sont beaucoup plus petites. L'invention permet de traiter rapidement une grande quantité de solution puisque le cyclage thermique a lieu à flux continu de liquide. Elle permet d'assurer un haut débit de liquide.

L'invention permet d'effectuer de nombreux protocoles tels que :

- tous les types de PCR comme la PCR, la RT-PCR, la PCR allèle spécifique, la Taq man PCR ... ;
- tous les types de LCR (Ligase Chain Reaction) comme la LCR, la Gap LCR, l'Asymetric Gap LCR, la RT-LCR, l'Oligonucleotide Ligation Assay (OLA), et la PCR-OLA ;
- les réactions de séquençage cyclique à partir de clones ou de réactions de PCR ;
- les réactions de microséquençage cyclique (single nucleotide primer extension) ; et
- toute autre opération biologique nécessitant des cyclages thermiques.

L'invention pourra présenter en outre au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- le dispositif est agencé de sorte que la solution est mise aux températures suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé et de sorte que la solution subit au moins deux fois le cycle lorsqu'elle parcourt une fois le canal ;
- le dispositif est agencé de sorte que la solution est mise à au moins trois températures différentes lorsqu'elle parcourt une fois le canal ;
- le dispositif comporte au moins deux canaux en communication mutuelle et des moyens pour donner à chaque canal au moins deux températures respectives prédéterminées et pour faire passer chaque canal au cours du temps de l'une à l'autre des températures associées de sorte que la solution est mise aux températures lorsqu'elle parcourt une fois chaque canal ;
- le canal étant un premier canal et les moyens de modification de la température étant aptes à la modifier durant une période prédéterminée, le dispositif comporte au moins un canal à température constante durant la période prédéterminée et communiquant avec le premier canal ;
- le dispositif comporte plusieurs canaux disposés en parallèle les uns aux autres, les canaux ayant des températures identiques entre eux à un instant quelconque donné ;
- le dispositif comporte une plaque dans laquelle est ménagé le ou chaque canal ; et

- la plaque est en silicium.

On prévoit également selon l'invention un procédé de réalisation de réactions chimiques ou biochimiques par cyclage thermique, dans lequel on alimente en continu au moins un canal avec une solution et on donne à la solution au moins deux températures prédéterminées de sorte que la solution est mise aux températures lorsqu'elle parcourt une fois le canal, dans lequel on fait passer le canal de l'une à l'autre des températures au cours du temps durant le parcours du canal par la solution.

Le procédé pourra présenter en outre au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- la réaction concerne de l'ADN ou des fragments d'ADN ;
- 10 - la réaction met en œuvre une synthèse d'ADN ou de fragment d'ADN ; et
- la réaction comprend une réaction de polymérisation en chaîne.

On prévoit en outre selon l'invention un produit ayant subi une réaction chimique ou biochimique réalisée selon un procédé conforme à l'invention.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront encore dans la description suivante de cinq modes préférés de réalisation donnés à titre d'exemples non limitatifs. Aux dessins annexés :

- les figures 11 à 15 sont des vues schématiques de dispositifs selon cinq modes de réalisation respectivement ;
- la figure 16 est une vue en plan d'un substrat utilisable pour ces cinq modes ; et
- 20 - les figures 17 et 18 sont des vues transversales en coupe selon les plans respectifs VII-VII et VIII-VIII de la figure 16.

On va décrire dans leurs principes en référence aux figures 11 à 15 cinq modes de réalisation du dispositif de l'invention appliqué ici à la mise en œuvre d'un protocole de PCR par cyclage thermique.

25 Dans le premier mode de réalisation illustré à la figure 11, le dispositif 101 comporte une unité de cyclage thermique 102 comprenant un substrat 103. Le substrat sera décrit plus bas en plus grands détails en référence aux figures 16 à 18. Le substrat 103 présente un canal 104 en communication de fluide par son extrémité amont avec un conduit d'alimentation amont 106 et par son extrémité aval avec un conduit de sortie aval  
30 108.

Le dispositif 101 comprend des moyens 105 pour faire parcourir en continu le canal 104 par une solution amenée par le conduit 106 et sortant par le conduit 108, la solution parcourant ainsi une seule fois le canal 104 suivant sa longueur durant tout le protocole. La solution contient les réactifs nécessaires pour la réalisation de la PCR.

L'unité 102 comprend des moyens pour chauffer ou refroidir à volonté le substrat 103, ces moyens étant classiques et connus en soi. Dans la suite et pour la simplicité, ces moyens seront appelés moyens de chauffage étant entendu qu'ils servent au chauffage et au refroidissement et ainsi permettent d'élever ou d'abaisser la température du substrat et du canal. Les moyens de chauffage sont agencés pour chauffer ou refroidir le substrat 103 dans son intégralité de sorte que quelle que soit la température qu'ils confèrent à un instant donné au canal 104, tous les tronçons du canal 104 ont même température entre eux.

L'unité 102 comprend des moyens pour commander les moyens de chauffage afin qu'ils donnent au canal 104 différentes températures successivement au cours du temps. Ces températures sont ici au nombre de trois et sont celles, connues, utilisées lors de la PCR. Ainsi, le canal 104 est d'abord placé à une température T1, puis refroidi à une température T2, puis réchauffé à une température intermédiaire T3. Cette succession temporelle forme un cycle de température. Ce cycle est répété de nombreuses fois au cours du temps, comme l'illustre le graphe de la figure 11. Ainsi, après une période à la température T3, le canal 104 est à nouveau placé à la température T1 pour le début d'un nouveau cycle et ainsi de suite.

Ce cyclage est effectué alors que la solution parcourt le canal depuis le conduit d'alimentation 106 jusqu'au conduit de sortie 108. On choisit ici la section du canal 104 et la vitesse de la solution de sorte que la solution portée aux différentes températures T1 T2 et T3, entre son entrée et sa sortie du canal, subit le cycle de vingt à trente fois par exemple. Par conséquent, les réactions de PCR se succèdent les unes aux autres. Les différents tronçons du canal qui d'amont en aval ont à un instant donné la même température, se différencient seulement par le fait qu'ils sont traversés par des fractions de solution respectives qui ont déjà subi un nombre de cyclages thermiques différent et d'autant plus élevé que ces fractions de solution s'approchent du conduit de sortie.

Le deuxième mode de réalisation, illustré à la figure 12 avec des références augmentées de 100, se différencie du précédent seulement par le fait que plusieurs canaux 204 s'étendant en parallèle sont ménagés dans le substrat 103. Il se passe dans chaque canal 204 de ce mode ce qui se passait dans le canal 104 du premier mode. Notamment, les moyens de chauffage effectuent le même cyclage thermique sur tout le substrat. Dans ce deuxième mode, à un instant quelconque, tous les tronçons de tous les canaux 204 ont même température entre eux. Les canaux 204 ont ici chacun leurs conduits d'alimentation et de sortie en propre. On peut ainsi traiter en même temps des solutions différentes.

Alternativement, les canaux 204 pourraient être associés à des conduits d'alimentation et de sortie communs, par exemple si la même solution parcourt les différents canaux.

Dans le troisième mode de réalisation illustré à la figure 13, et pour lequel les références des éléments analogues sont augmentées de 200, le dispositif comporte à nouveau plusieurs canaux. De plus, il comporte cette fois non plus une seule unité de cyclage thermique 302 (à substrat, moyens de chauffage et moyens de commande), mais plusieurs unités 302a, 302b de ce type, par exemple au nombre de deux. Les deux unités 302a, 302b sont disposées en série de sorte que les canaux 304a, 304b de l'unité amont 302a communiquent par leur extrémité aval et via des conduits de transfert respectifs 309 avec les extrémités amont des canaux 304b de l'unité aval 302b. Chaque ensemble de canaux en communication mutuelle forme un circuit.

L'unité amont 302a est en soi identique à celle du deuxième mode et soumet la solution au cyclage thermique déjà décrit associé aux températures T1, T2 et T3. L'unité aval 303b effectue en l'espèce un cyclage thermique dont les paramètres sont différents de ceux du cyclage de l'unité amont. Ainsi, ce cyclage aval est associé à trois températures T4, T5 et T6, différentes des températures T1, T2 et T3. De plus, la durée et la succession des températures, illustrées au graphe le plus bas sur la figure 3, sont différentes de celles du premier cyclage. Par conséquent, la solution parcourant chaque circuit subit d'abord plusieurs fois le cyclage de l'unité amont 302a à mesure qu'elle parcourt cette unité, puis traverse le conduit de transfert 309 et arrive sur l'unité aval 302b où elle subit le cyclage propre à cette unité, et ce plusieurs fois pourvu que la vitesse de la solution dans cette unité soit suffisamment lente. La solution sort enfin du dispositif 301 par le conduit de sortie 308.

Dans le dispositif selon le quatrième mode de réalisation illustré à la figure 14, les références numériques des éléments analogues ont été augmentées de 300. Le dispositif 401 comporte une unité de cyclage thermique 402 semblable à celle du deuxième mode. Il comporte en outre deux unités 410a et 410b comprenant chacune un substrat 403 et des moyens pour assurer aux canaux 412 traversant ces unités une température, respectivement T7 et T8, temporellement constante. Les trois unités 410a, 402 et 410b sont disposées en série et dans cet ordre avec leurs canaux respectifs en communication d'amont en aval. Ainsi, la solution introduite dans un conduit d'alimentation 406 parcourt un canal 412 de l'unité amont 410a où elle est placée à la température T7 constante pendant une période prédéterminée, notamment supérieure à la durée d'un cycle de l'unité 402. Elle franchit ensuite le conduit de transfert 409 puis arrive dans l'unité de cyclage thermique 402 où elle

subit le cycle thermique plusieurs fois. Puis, passant dans le deuxième conduit de transfert 409, elle débouche dans l'unité aval 410b à température constante  $T_5$  où elle demeure à cette température pendant une autre période prédéterminée. Elle est ensuite évacuée du dispositif par le conduit de sortie 408.

5 En référence à la figure 15, dans laquelle les éléments analogues portent des références augmentées de 400, on a illustré un cinquième mode de réalisation dans lequel un conduit secondaire 514 débouche dans le conduit d'alimentation 506.

Ainsi, on forme la solution à traiter, par exemple par un mélange de réactifs, juste avant l'arrivée sur l'unité de cyclage thermique qui est identique à celle du deuxième mode  
10 502. On forme ainsi un mélangeur amont. Alternativement ou cumulativement, on peut prévoir un séparateur aval en mettant le conduit de sortie en communication latérale avec un conduit de dérivation.

Naturellement, on pourra combiner ces différents modes de réalisation entre eux, par exemple en ajoutant au moins une unité à température fixe au dispositif de la figure 3.

15 Il importe de noter que ces différents modes de réalisation mettent en œuvre le protocole avec une solution à flux continu ininterrompu.

On a détaillé aux figures 16 à 18 une unité 2 de cyclage thermique à plusieurs canaux 4 utilisable dans les modes de réalisation présentés. Le substrat 3 comprend ici une plaque 16 en silicium, mais cette plaque pourrait être réalisée dans un autre matériau, par  
20 exemple en verre, en quartz, en matériau polymère ou en matière plastique. Des canaux 4 sont réalisés par gravure chimique de micro-rainures (de façon connue en soi) dans une face supérieure de la plaque. Chaque canal 4 est rectiligne et a un profil en triangle isocèle (ou en « V ») dont un côté s'étend dans le plan de la face de la plaque. Une rampe inclinée relie le fond du canal à la face de la plaque à chaque extrémité du canal. A ce stade, chaque  
25 canal 4 est ouvert en partie supérieure de la plaque. Le substrat 3 comprend une deuxième plaque 18 présentant des orifices 20 aptes à venir en coïncidence avec les extrémités des canaux. Cette plaque s'étend sur la plaque 16. Elle obture ainsi la face supérieure des canaux et donne accès à ceux-ci.

La solution circule dans l'un des orifices, puis dans le canal 4 associé, puis dans  
30 l'autre orifice. La deuxième plaque 18 peut être réalisée dans le même type de matériaux que la première 16. Les deux plaques sont scellées ou collées l'une sur l'autre par exemple.

Un avantage du silicium est que le silicium est un bon conducteur thermique, ce qui donne des temps de réponse en température très courts. De plus, les microtechnologies sur



silicium sont largement connues et il est facile de contrôler parfaitement les dimensions des canaux. Un exemple de dimensions des canaux est :

- largeur des canaux : 100  $\mu\text{m}$  (de quelques microns à quelques centaines de microns est aussi envisageable) ;
- 5 - longueur des canaux : jusqu'à plusieurs centimètres.

Les moyens de chauffage 20 sont placés sous la plaque 16 contre sa face inférieure opposée à celle supérieure portant les canaux. Ils assurent le chauffage et le refroidissement de la plaque de façon connue en soi, par exemple par effet Pelletier, effet Joule, rayonnement ou convection.

- 10 Notons aussi qu'il est possible d'intégrer les moyens de chauffage 20 directement sur le silicium, par exemple en usinant des résistances chauffantes à la surface d'une des deux plaques 16, 18, et en plaçant l'ensemble sur une source froide pour évacuer la chaleur.

- 15 Durant le passage de la solution sur l'unité 2, le nombre de cyclages est fonction du temps passé par la solution sur l'unité. Il est donc important de bien contrôler le débit de la solution. Ce contrôle pourra être effectué au moyen d'un pousse-seringue ou par pompage (force de pression ou électro-osmose par exemple).

Les différents canaux d'un même dispositif peuvent par exemple servir au parcours de solutions comprenant différents ADN.

- 20 Le canal pourra être aussi formé par un tube capillaire, pourvu que le contrôle de la température de la solution demeure possible.

- Il va de soi que les températures T1 à T8 seront en général différentes de la température ambiante et que le dispositif comporte dans chaque mode de réalisation des moyens automatisés de commande de la température de l'unité de cyclage thermique pour 25 l'exécution du cyclage.

### **Typage d'acides nucléiques dans un dispositif à flux continu**

- De nombreuses techniques ont été développées pour détecter ou typer les mutations et les polymorphismes. La technique dite de « microséquençage » permet d'identifier le nucléotide présent à une position donnée dans un acide nucléique. La technique de 30 microséquençage a été développée pour le typage de SNPs (single nucleotide polymorphisms) et pour la détection de mutations ponctuelles mais cette technique est aussi utilisable pour la détection de polymorphismes plus complexes. Cette technique et plus précise que les techniques de typage de SNPs basés sur l'hybridation car elle combine la spécificité de l'hybridation avec la spécificité de la reconnaissance enzymatique du

nucléotide par une polymérase. Le nucléotide d'intérêt est détecté par l'extension d'une amorce avec un ddNTP (base nucléotidique bloquante). Une amorce complémentaire à la région directement en amont du nucléotide d'intérêt est utilisée. Cette amorce est appariée avec l'acide nucléique cible de manière à ce que l'extrémité 3' de l'amorce soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter. Cette amorce initie la synthèse du brin complémentaire par une polymérase en présence de ddNTPs et permet l'élongation de cette amorce avec un seul ddNTP qui est le complément du nucléotide présent dans l'acide nucléique cible. Le ddNTP incorporé est ensuite détecté. De préférence les ddNTPs sont marqués pour faciliter leur détection.

Pour la détection d'un nucléotide spécifique dans un échantillon tel que de l'ADN génomique par exemple, cette technique de microséquençage doit être précédée d'une étape pour amplifier la région portant le polymorphisme à analyser. Après la réaction d'amplification, il s'agit en général d'une réaction de PCR, une purification de l'échantillon d'ADN est nécessaire pour enlever l'excès de dNTPs et les amorces PCR. Après la réaction de microséquençage une deuxième étape de purification est utilisée pour enlever l'excès de ddNTPs marqués avant la détection du ddNTP incorporé à l'extrémité 3' de l'amorce de microséquençage. Cette dernière purification implique en général une séparation sur gel. Le protocole de génotypage par microséquençage est donc complexe, il implique différentes étapes comportant chacune le mélange de réactifs et des temps de réactions longs. Les différentes réactions enzymatiques du protocole doivent être effectuées à des températures précises, la PCR et la réaction de microséquençage sont réalisés par cyclage thermique.

Le génotypage d'un grand nombre de polymorphismes tels que des SNPs sur des familles ou sur des groupes cas/contôles permet de trouver des associations entre certains polymorphismes et certains phénotypes. Ces études d'association conduisent ainsi à l'identification de gènes impliqués dans des pathologies, dans réponse à des produits thérapeutiques et dans d'autres phénotypes complexes.

Un des facteurs limitant de ces études d'association est la nécessité de génotyper plusieurs centaines d'individus pour plusieurs milliers ou dizaines de milliers de polymorphismes.

De nombreuses recherches sont donc menées actuellement pour mettre au point des techniques de génotypage et notamment des techniques de microséquençage à grande échelle.

Un protocole en phase homogène ont été mis au point dans lesquels la PCR, la purification, la réaction de microséquençage et la détection sont réalisées en solution dans le puit d'une microplaque (Chen et al., *Proc.Natl.Acad. Sci. USA*, la 94/20 : 10756-10761, 1997). Dans ce protocole en phase homogène le ddNTP incorporé est détecté par fluorescence par transfert d'énergie, l'amorce de microséquençage est donc marquée. Malgré l'intégration de toutes les étapes dans une microplaque cette méthode ne permet pas un génotypage à très grande échelle. En effet, l'addition successive des réactifs dans la microplaque impose un très grand nombre de distributions à chaque étape du protocole. Ces distributions peuvent être automatisées à l'aide d'un robot de dispense mais les distributions sont alors extrêmement lentes et les risques d'évaporation deviennent importants. Les volumes réactionnels restent donc conséquents (10-100  $\mu$ l) impliquant une consommation importante d'échantillon et de réactifs souvent très coûteux. De plus, une manipulation manuelle des microplaques est nécessaire pour effectuer les différents traitements thermiques ainsi que les distributions entre chaque étape.

Un but de l'invention est de fournir un dispositif et des procédés pour le génotypage à très grande échelle. En vue de la réalisation de ce but le protocole de génotypage est intégré en flux continu dans un dispositif microfluidique conforme à l'invention. La distribution des réactifs est entièrement automatisée et les traitements thermiques sont intégrés dans le dispositif. Le substrat microfluidique constitue un système clos et les risques d'évaporation du mélange réactionnel sont donc éliminés. On obtient ainsi une miniaturisation des volumes réactionnels qui s'accompagne d'une consommation très réduite d'échantillon et de réactif. Le protocole est réalisé en parallèle et en série sur des centaines de canaux pour obtenir un génotypage à très grande échelle. En outre, la combinaison d'un substrat microfluidique semi-jetable et amovible avec des éléments externes fixes (systèmes d'alimentation en fluides, support thermique) est la garantie d'une réduction des coûts.

La figure 19 est une coupe d'un substrat microfluidique 100 pour le génotypage intégré en flux continu. Sur cette figure sont représentés des cuvettes d'entrée 102 et des cuvettes de sortie 104. Des canaux internes 108 disposés en parallèle relient respectivement une cuvette d'alimentation et une cuvette de sortie. Les cuvettes d'alimentation et les cuvettes de sortie sont formées pour l'essentiel par une ouverture traversante pratiquée dans un substrat 100a. Les canaux 108 se présentent sous la forme de rainures gravées dans un substrat 100b. La figure représente également des réservoirs à réactifs 122a, 122b, 122c agencés entre les cuvettes d'alimentation 102 et les cuvettes de

sortie 104. Des raccords permettent de relier chacun des réservoirs à réactif à tous les canaux 108. On observe que le substrat microfluidique comporte une pluralité de canaux en parallèle. Typiquement au moins 100 canaux sont disposés en parallèle.

Le substrat 102b est aminci de façon à favoriser les échanges thermiques lorsque le substrat microfluidique est rapporté sur le support thermique.

Bien que non représentés sur la figure les cuvettes d'alimentation et les réservoirs sont respectivement associés à des systèmes d'alimentation en fluides pour l'alimentation en continu des canaux avec des échantillons et pour la distribution des réactifs.

Le support thermique sur lequel est rapporté le substrat microfluidique n'est pas représenté. Ce support thermique comporte plusieurs zones thermostatées dont des zones cyclables. Ces zones thermostatées coïncident avec les sections des canaux 108 situés entre les réservoirs à réactifs 122a et 122b ainsi qu'avec les sections des canaux 108 situés entre le réservoir à réactifs 122c et les cuvettes de sortie 104.

Le dispositif conforme à l'invention comporte également un système de détection au niveau des cuvettes de sortie. La détection s'effectue en parallèle et en série sur l'ensemble des canaux 108. Alternativement la détection ne s'effectue pas au niveau des cuvettes de sortie mais légèrement en amont à la sortie de la dernière zone thermostatée. Dans ce cas une plaque de matériel transparent (verre ou quartz par exemple) peut remplacer localement le substrat 100a afin de détecter directement les échantillons parcourant le canal.

De manière particulièrement avantageuse, l'injection des échantillons et des réactifs, la régulation des températures réactionnelles et des cycles de température ainsi que la détection sont entièrement automatisés.

Les échantillons sont injectés en flux continu dans les canaux 108 par les cuvettes d'alimentation 102. De préférence un même ADN est injecté en série dans un canal 108, les injections d'ADN sont séparées les unes des autres par des « bouchons » d'un fluide inerte non miscible. Les injections sont synchrones sur tous les canaux 108 disposés en parallèle. Les échantillons injectés à un temps  $t$  parcourent les canaux de façon synchrone de telle sorte que les injections de réactifs et la détection s'effectuent simultanément en parallèle sur tous les canaux.

Les réactifs PCR sont injectés en parallèle dans tous les canaux au niveau du réservoir à réactif 122a. Un seul et même réactif est injecté à un temps  $t$  et dans tous les canaux en parallèle. Par contre, dans le but de typer le même ADN pour 100 sites polymorphes, 100 réactifs différents sont injectés en série dans un canal donné. Etant

donné que 100 canaux sont disposés en parallèle sur le substrat microfluidique, 100 ADN<sub>s</sub> sont typés en parallèle sur un même substrat. Les injections dans un même canal sont séparées les unes des autres par des injections de « bouchons ».

Le mélange réactionnel parcourt ensuite une zone thermostatée cyclable où s'effectue la réaction d'amplification. Notons que le canal est rectiligne et que le mélange réactionnel ne parcourt qu'une seule zone thermique. Les avantages de cette disposition particulière selon l'invention sont décrits ci-dessus. Remarquons aussi qu'étant donné les caractéristiques de la réaction PCR il importe peu à quelle température du cycle se trouve la zone thermostatée au moment où une fraction de l'échantillon entre sur cette zone. Enfin il faut remarquer que cette disposition permet de faire varier à volonté le nombre de cycles thermiques effectués (typiquement entre 15 et 35 cycles pour une PCR) en réglant les temps de cyclages et le débit de la solution parcourant le canal.

La deuxième étape du protocole, la réaction de purification des produits PCR, débute avec l'injection du réactif de purification au niveau du réservoir 122b. Le même réactif est injecté en parallèle et en série dans tous les canaux 108.

Le mélange réactionnel parcourt ensuite une première zone thermostatée à 37°C pour la réaction de purification et une zone thermostatée à 94°C pour l'inactivation des enzymes de purification.

La réaction de microséquençage débute avec l'injection des réactifs de microséquençage. Comme précédemment pour les réactifs PCR, un réactif différent est utilisé pour le typage de chaque polymorphisme. Pour le typage de 100 polymorphismes 100 réactifs différents sont injectés en série dans un même canal 108.

Le mélange réactionnel parcourt ensuite une deuxième zone thermostatée cyclable où s'effectue la réaction de microséquençage.

A la sortie de cette zone thermostatée s'effectue la détection en flux continu, en parallèle et en série des ddNTPs incorporés à l'extrémité 3' de l'amorce de microséquençage. Typiquement les ddNTPS sont marqués avec des fluorophores.

La détection s'effectue en solution par mesure de la fluorescence, de la corrélation temporelle de fluorescence ou par spectropolarimétrie. Ces moyens de détection sont connus par ailleurs.

#### **Exemple : Intégration d'un protocole de génotypage dans un dispositif microfluidique à flux continu**

Le mélange réactionnel parcourt un canal dans lequel sont effectuées toutes les étapes nécessaires à un protocole de génotypage : PCR, purification, réaction de microséquençage et détection.

Le substrat microfluidique comporte 100 canaux en parallèle. Ces canaux sont rectilignes et ont un diamètre de l'ordre de 600  $\mu\text{m}$  dans les zones réactionnelles. La surface de la section d'un canal est de l'ordre de 0.25  $\text{mm}^2$ .

Le protocole de génotypage est réalisé en parallèle dans les 100 canaux. En outre, 100 échantillons à la suite sont injectés dans chaque canal. Le substrat microfluidique permet donc grâce à une distribution croisée de 100 échantillons par 100 polymorphismes de réaliser 10 000 réactions de génotypage sur un substrat microfluidique.

L'injection des réactifs s'effectue en différents points du canal, elle est synchronisée de façon à pouvoir réaliser les réactions en série, en parallèle et en flux continu.

Pour éviter toute contamination, un canal donné est alimenté en série avec un même ADN. Cependant cet ADN est analysé pour 100 polymorphismes différents.

Le substrat microfluidique est silanisé selon le protocole décrit par Schoffner et al. (Chip PCR.1 Surface passivation of microfabricated silicon-glass chip for PCR. Mann A. Schoffner, J. Cheng, G. E. Hovichia, L. J. Kricka, P. Wilding. Nucleic Acid Research, 1996 Vol. 24, No. 2, p 375-379). Les substrats silanisés peuvent être stockés ainsi pendant plusieurs mois. L'étape de silanisation des substrats peut être réalisée lors de la fabrication du substrat. Avant utilisation du substrat, tous les canaux sont remplis d'eau préalablement dégazée et filtrée. Un débit élevé de l'ordre de 25  $\mu\text{l}/\text{min}$  est appliqué pendant 15 minutes afin de chasser toutes les bulles d'air présentes dans les circuits. Une solution 10mM Tris-HCl et 50 mM KCl pH 8.3 préalablement dégazée et filtrée est ensuite injectée à un débit de 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  pendant 15 min en prenant bien soin de ne pas former de bulles d'air.

Cette opération se fait préférentiellement sur un dispositif extérieur à la chaîne de génotypage pouvant traiter plusieurs substrats en parallèle.

Chaque échantillon d'ADN est dilué dans un tampon 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8.3 préalablement dégazé et filtré afin d'obtenir 30  $\mu\text{l}$  d'une solution finale à 1 ng/ $\mu\text{l}$  en ADN. Une préparation d'ADN par canal est nécessaire. Chaque réaction de génotypage utilise 0.25  $\mu\text{l}$  de cette solution, 30  $\mu\text{l}$  correspond à la quantité nécessaire pour faire 100 génotypes successifs sur le même individu. Cette solution est placée dans le dispositif d'injection en parallèle et en série des échantillons.

Pour chaque couple d'amorces PCR, il faut préparer 30  $\mu$ l d'une solution : 0.6  $\mu$ M de chaque amorce PCR, non purifiée, 20 mM Tris-HCl et 100 mM KCl pH 8.3 préalablement dégazée et filtrée, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et 1U de Taq Gold. Une préparation par site à génotyper est nécessaire.

- 5 Chaque réaction de génotypage utilise 0.25  $\mu$ l de cette solution pour un volume réactionnel final de 0.5  $\mu$ l, 30  $\mu$ l correspond à la quantité nécessaire pour faire 100 génotypages en parallèle sur 100 canaux différents. Ces solutions sont placées dans le dispositif d'injection en série des amorces PCR et sont conservées à 4°C.

- Le mélange réactionnel de purification PCR est commun à toutes les réactions de  
10 génotypage. Un volume de 5500  $\mu$ l d'une solution : 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub> préalablement dégazée et filtrée, 550 U de phosphatase alcaline de crevette (SAP) et 550 U d'exonucléase I, est préparé et stocké à 4°C dans le dispositif de distribution du mélange réactionnel de purification PCR. Chaque réaction de génotypage utilise 0.5  $\mu$ l de  
15 cette solution pour un volume réactionnel final de 1  $\mu$ l. 5500  $\mu$ l correspond à la quantité nécessaire pour faire 10 000 génotypages en parallèle.

- Pour chaque oligonucléotide de microséquençage, il faut préparer 120  $\mu$ l d'une solution : 1  $\mu$ M d'oligonucléotide de microséquençage, 40 mM Tris-HCl pH 9.5 préalablement dégazée et filtrée, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 nM d'un ddNTP-Tamra et 10nM d'un ddNTP-Fam, chaque ddNTP correspondant à un allèle du site, et 6 U de Thermosequenase.  
20 Une préparation par site à génotyper est nécessaire. Chaque réaction de génotypage utilise 1  $\mu$ l de cette solution pour un volume réactionnel final de 2  $\mu$ l, 120  $\mu$ l correspond à la quantité nécessaire pour faire 100 génotypages en parallèle sur 100 canaux différents. Ces solutions sont placées dans le dispositif d'injection en série des amorces de microséquençage et sont conservées à 4°C.

- 25 Les débits en sortie de substrat sont de 40  $\mu$ l / heure, ce qui permet pour des réactions de 2  $\mu$ l de réaliser 10 réactions/canal/heure séparées par 10 bouchons de 2  $\mu$ l. Les bouchons séparateurs sont composés de liquide non miscible avec les milieux réactionnels comme l'huile de paraffine par exemple. Ils séparent physiquement les réactions des unes des autres tout au long du parcours dans le canal et ont un volume  
30 équivalent au volume réactionnel.

L'échantillon d'ADN est distribué dans un volume de 0.25  $\mu$ l par réaction de génotypage. Il est injecté avec un débit de 5  $\mu$ l / heure ce qui représente un temps de 3 minutes et une longueur de 1mm. Chaque injection d'échantillon est séparée par 0.25  $\mu$ l de bouchon non miscible.

0.25 µl de réactif PCR sont injectés avec un débit de 5 µl / heure et se mélangent aux échantillons d'ADN. Chaque injection de réactif PCR est séparée par l'injection de 0.25 µl de bouchon non miscible. La réaction PCR représente donc un volume de 0.5 µl une longueur dans le canal de 2 mm et se déplace avec un débit de 10 µl / heure.

- 5 Ce mélange réactionnel parcourt une zone thermostatée à 94°C pendant 10 minutes pour activer la polymérase. Il parcourt ensuite une zone cyclable dont un cycle est composé par une étape de 10 sec. à 94°C puis 10 sec. à 55°C et 10 sec. à 72°C pour une durée correspondant à 35 cycles.

- Après la PCR, 0.5 µl de réactif pour la purification PCR sont injectés avec un débit  
10 de 10 µl/heure. Chaque injection de réactif est séparée par l'injection de 0.5 µl de bouchon. La réaction de purification PCR représente donc un volume de 1 µl une longueur dans le canal de 4 mm et se déplace avec un débit de 20 µl / heure.

- Ce mélange réactionnel parcourt alors une zone thermostatée à 37°C pendant 20 minutes pour la réaction de purification puis une zone thermostatée à 94°C pendant 10  
15 minutes pour l'inactivation des enzymes de purification (SAP et EXO I).

Ensuite 1 µl de réactif de microséquençage est injecté avec un débit de 20 µl/heure. Chaque injection de réactif de microséquençage est séparée par l'injection de 1 µl de bouchon non miscible. La réaction de microséquençage représente donc un volume de 2 µl une longueur dans le canal de 8 mm et se déplace avec un débit de 40 µl / heure.

- 20 Ce mélange réactionnel de microséquençage (2 µl) parcourt une zone cyclable dont un cycle est composé par une étape de 10 sec. à 94°C puis 10 sec. à 55°C et 10 sec. à 72°C pour une durée correspondant à 25 cycles.

La détection est réalisée en ligne et en continue après la zone de microséquençage.

- La détection est réalisée en mesurant la fluorescence polarisée pour les  
25 fluorophores Fam et Tamra. Les longueurs d'ondes d'excitation sont respectivement 488 nm et 520 nm alors que les longueurs d'onde d'émission sont de 520 nm et 575 nm. Deux mesures de fluorescence sont réalisées simultanément, l'une dans le plan de polarisation du faisceau d'excitation et l'autre dans le plan perpendiculaire à celui-ci. Le rapport de ces deux mesures permet de différencier la présence d'un oligonucléotide marqué  
30 (oligonucléotide de microséquençage allongé lors de la réaction) parmi deux à cinq fois plus de marqueurs libres.



**REVENDICATIONS**

1. Dispositif d'analyse biochimique comprenant :
  - a) un substrat microfluidique comportant au moins un canal possédant une cuvette d'alimentation pour injecter un échantillon, une cuvette de sortie pour recueillir ledit échantillon et au moins un réservoir à réactif relié à chaque canal entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie ;
  - b) des moyens pour alimenter ledit canal en flux continu.
- 10 2. Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que le substrat microfluidique comporte une pluralité de canaux disposés en parallèle.
3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2 dans lequel les moyens pour alimenter ledit canal en flux continu appliquent une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie.
- 15 4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1-3 dans lequel ledit substrat microfluidique est en silicium.
- 20 5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1-4 comprenant un support thermique présentant une face d'échange thermique en contact avec une face du substrat microfluidique de sorte que l'échantillon parcourant le canal est porté à une température déterminée.
- 25 6. Dispositif selon la revendication 5 dans lequel la face du substrat microfluidique en contact avec la face d'échange thermique du support thermique présente une paroi mince.
7. Dispositif selon la revendication 5 ou 6 dans lequel le substrat microfluidique est rapporté de façon amovible sur le support thermique.
- 30 8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5-7 dans lequel le support thermique comporte au moins deux zones thermostatées à des températures différentes

agencées de sorte que l'échantillon parcourant le canal est porté successivement à au moins deux températures déterminées.

9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5-8 dans lequel au moins une zone thermostatée est portée à au moins deux températures distinctes de sorte que l'échantillon parcourant une fois cette zone est porté à au moins deux températures prédéterminées.
10. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5-8 dans lequel au moins une zone thermostatée est portée à au moins deux températures distinctes suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé de telle sorte que l'échantillon subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.
11. Dispositif selon l'une des revendications 8 ou 9 caractérisé en ce que la partie du canal traversant la zone thermostatée est rectiligne.
12. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1-11 comprenant des moyens de détection pour mesurer une caractéristique physico-chimique des échantillons parcourant les canaux.
13. Dispositif selon la revendication 12 dans lequel lesdits moyens de détection sont localisés au niveau des cuvettes de sortie desdits canaux.
14. Procédé pour la réalisation de protocoles biochimiques sur au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
  - a) on alimente un canal en flux continu avec une solution contenant au moins un échantillon en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal,
  - b) on injecte au moins un réactif à partir d'au moins un réservoir à réactif dans ledit canal de manière à mélanger ledit échantillon et ledit réactif.
15. Procédé pour la réalisation de protocoles biochimiques sur au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution contenant au moins un échantillon en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal,
- b) on injecte au moins un réactif à partir d'au moins un réservoir à réactif dans ledit canal  
5 de manière à mélanger ledit échantillon et ledit réactif,
- c) on détecte au moins un paramètre physico-chimique dudit échantillon dans ledit canal.
16. Procédé selon l'une des revendications 14 ou 15 dans lequel la solution parcourt au moins une zone thermostatée de sorte que la solution est mise à une température  
10 déterminée lorsqu'elle parcourt ladite zone thermostatée.
17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14-16 dans lequel la solution parcourt au moins une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées de sorte que la solution est mise successivement aux dites  
15 températures lorsqu'elle parcourt une fois ladite zone thermostatée.
18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14-17 dans lequel la solution parcourt une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé de telle  
20 sorte que la solution subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.
19. Procédé selon la revendication 18 dans lequel la solution subit de 1-35 fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.
- 25 20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14-19 dans lequel on alimente séquentiellement ledit canal avec une pluralité d'échantillons séparés les uns des autres par des bouchons.
- 30 21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14-20 dans lequel les étapes a), b) et éventuellement c) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

22. Procédé pour la réalisation en flux continu d'au moins un cycle de température sur une solution contenant au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) on alimente un canal en flux continu avec ladite solution,
  - 5 b) on fait parcourir à ladite solution une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé de telle sorte que la solution subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.
- 10 23. Procédé pour la réalisation en flux continu d'au moins un cycle de température sur une solution contenant au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) on alimente un canal en flux continu avec ladite solution,
  - b) on fait parcourir à ladite solution une zone thermostatée portée successivement à au
  - 15 moins deux températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé de telle sorte que la solution subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.
  - c) on détecte au moins un paramètre physico-chimique dudit échantillon dans ledit canal.
- 20 24. Procédé selon l'une des revendications 22 ou 23 dans lequel on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.
- 25 25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 22-24 dans lequel on alimente séquentiellement ledit canal avec une pluralité d'échantillons séparés les uns des autres par des bouchons.
- 30 26. Procédé selon l'une quelconque des revendications 22-25 dans lequel les étapes a), b) et éventuellement c) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.
27. Procédé pour l'amplification d'acides nucléiques caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on mélange ledit acide nucléique avec des réactifs appropriés pour l'amplification d'acides nucléiques,
- b) on alimente un canal en flux continu avec le mélange réactionnel,
- c) on fait parcourir à ce mélange réactionnel une zone thermostatée portée successivement  
5 à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé,
- d) on choisit les températures et la durée du cycle de température de la zone thermostatée ainsi que le temps mis par le mélange pour parcourir la zone thermostatée de telle sorte que l'acide nucléique subit plusieurs fois le cycle dénaturation-hybridation-élongation.

10

28. Procédé pour l'amplification d'acides nucléiques caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution comprenant ledit acide nucléique,
- 15 b) on injecte au moins un réactif approprié pour l'amplification d'acides nucléiques à partir d'au moins un réservoir à réactif dans ledit canal de manière à mélanger ledit acide nucléique et ledit réactif,
- c) on fait parcourir à ce mélange réactionnel une zone thermostatée portée successivement à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle  
20 prédéterminé,
- d) on choisit les températures et la durée du cycle de température de la zone thermostatée ainsi que le temps mis par le mélange pour parcourir la zone thermostatée de telle sorte que l'acide nucléique subit plusieurs fois le cycle dénaturation-hybridation-élongation.

25 29. Procédé selon la revendication 27 ou 28 dans lequel on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.

30 30. Procédé selon l'une des revendications 27-29 dans lequel ledit canal est formé dans un substrat en silicium.

31. Procédé selon l'une quelconque des revendications 27-30 dans lequel on alimente séquentiellement ledit canal avec une pluralité d'acides nucléiques séparés les uns des autres par des bouchons.

32. Procédé selon l'une quelconque des revendications 27-31, dans lequel les étapes a), b), c) et d) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

5 33. Procédé pour la détection en flux continu d'au moins un nucléotide dans au moins un acide nucléique cible caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) on alimente un canal en flux continu avec une solution comprenant ledit acide nucléique ;

10 b) on injecte le réactif de microséquençage comprenant le tampon de microséquençage, l'amorce de microséquençage, au moins un ddNTP et une polymérase, dans ledit canal de manière à mélanger ledit acide nucléique et ledit réactif;

c) on fait parcourir à la solution au moins une zone thermostatée de façon à obtenir au moins un cycle comprenant la dénaturation de l'acide nucléique cible, l'hybridation dudit acide nucléique avec l'amorce de microséquençage et l'incorporation du ddNTP, complémentaire au nucléotide à détecter, à l'extrémité 3' de ladite amorce ;

15 d) on détecte au moins un ddNTP incorporé à l'extrémité 3' de l'amorce de microséquençage.

20 34. Procédé selon la revendication 33 dans lequel on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.

25 35. Procédé selon l'une des revendications 33 ou 34 dans lequel à l'étape c) la zone thermostatée est portée successivement à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant au moins un cycle.

30 36. Procédé selon l'une des revendications 33-35 dans lequel les ddNTPs sont marqués avec des fluorophores et dans lequel à l'étape d) on détecte la fluorescence du ddNTP incorporé.

37. Procédé selon l'une quelconque des revendications 33-36 dans lequel les étapes a), b), c) et d) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

38. Procédé pour la détection en flux continu d'au moins un nucléotide dans au moins un acide nucléique cible caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution contenant au moins un acide nucléique cible ;
  - 5 b) on injecte le réactif pour l'amplification de la région de l'acide nucléique cible portant au moins un nucléotide à détecter, dans ledit canal à partir d'un premier réservoir à réactif;
  - c) on fait parcourir à la solution au moins une zone thermostatée de telle sorte que l'acide nucléique subit plusieurs fois le cycle dénaturation-hybridation-élongation;
  - 10 d) on injecte le réactif pour la purification du produit d'amplification dans ledit canal à partir d'un deuxième réservoir à réactif;
  - e) on fait parcourir à la solution au moins une zone thermostatée pour réaliser la réaction de purification ;
  - f) on injecte le réactif de microséquençage comprenant le tampon de microséquençage, l'amorce de microséquençage, au moins un ddNTP et une polymérase, dans ledit canal
  - 15 à partir d'un troisième réservoir à réactif;
  - g) on fait parcourir au mélange réactionnel au moins une zone thermostatée de façon à obtenir au moins un cycle comprenant la dénaturation de l'acide nucléique cible, l'hybridation dudit acide nucléique avec l'amorce de microséquençage et
  - 20 l'incorporation du ddNTP, complémentaire au nucléotide à détecter, à l'extrémité 3' de ladite amorce ;
  - h) on détecte au moins un ddNTP incorporé à l'extrémité 3' de l'amorce de microséquençage.
- 25 39. Procédé selon la revendication 38 dans lequel on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.
40. Procédé selon l'une des revendications 38-39 dans lequel aux étapes c) et e) la zone thermostatée est portée successivement à des températures déterminées suivant une
- 30 succession temporelle formant au moins un cycle.

41. Procédé selon l'une des revendications 38-40 dans lequel les ddNTPs sont marqués avec des fluorophores et dans lequel à l'étape h) on détecte la fluorescence du ddNTP incorporé.
- 5 42. Procédé selon l'une des revendications 38-41 dans lequel le réactif pour la purification, comprend une exonucléase et une alcaline phosphatase.
43. Procédé selon l'une quelconque des revendications 38-42 dans lequel les étapes a), b), c), d), e), f), g) et h) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en
- 10 parallèle.

ORIGINAL

15



20



**REVENDICATIONS**

1. Dispositif d'analyse biochimique comprenant :
  - a) un substrat microfluidique en matériau polymère, notamment en polydiméthylsiloxane (PDMS), comportant au moins un canal possédant une cuvette d'alimentation pour injecter un échantillon, une cuvette de sortie pour recueillir ledit échantillon et au moins un réservoir à réactif relié à chaque canal entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie ;
  - b) des moyens pour alimenter ledit canal en flux continu.
2. Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que le substrat microfluidique comporte une pluralité de canaux disposés en parallèle.
3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2 dans lequel les moyens pour alimenter ledit canal en flux continu appliquent une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie.
4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il comporte des moyens pour donner au canal au moins deux températures prédéterminées de sorte que l'échantillon est porté à ces températures lorsqu'il parcourt une fois le canal.
5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1-4 comprenant un support thermique présentant une face d'échange thermique en contact avec une face du substrat microfluidique de sorte que l'échantillon parcourant le canal est porté à une température déterminée.
6. Dispositif selon la revendication 5 dans lequel la face du substrat microfluidique en contact avec la face d'échange thermique du support thermique présente une paroi mince.
7. Dispositif selon la revendication 5 ou 6 dans lequel le substrat microfluidique est rapporté de façon amovible sur le support thermique.

8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5-7 dans lequel le support thermique comporte au moins deux zones thermostatées à des températures différentes agencées de sorte que l'échantillon parcourant le canal est porté successivement à au moins deux températures déterminées.
- 5
9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 comprenant une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures distinctes de sorte que l'échantillon parcourant une fois cette zone est porté à au moins deux températures prédéterminées.
- 10
10. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5 à 8 dans lequel au moins une zone thermostatée est portée à au moins deux températures distinctes suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé de telle sorte que l'échantillon subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.
- 15
11. Dispositif selon l'une des revendications 8 ou 9 caractérisé en ce que la partie du canal traversant la zone thermostatée est rectiligne.
- 20
12. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 comprenant des moyens de détection pour mesurer une caractéristique physico-chimique des échantillons parcourant les canaux.
- 25
13. Dispositif selon la revendication 12 dans lequel lesdits moyens de détection sont localisés au niveau des cuvettes de sortie desdits canaux.
- 30
14. Procédé pour la réalisation de protocoles biochimiques sur au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution contenant au moins un échantillon en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal,
- b) on injecte au moins un réactif à partir d'au moins un réservoir à réactif dans ledit canal de manière à mélanger ledit échantillon et ledit réactif.

15. Procédé pour la réalisation de protocoles biochimiques sur au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution contenant au moins un échantillon en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal,
  - b) on injecte au moins un réactif à partir d'au moins un réservoir à réactif dans ledit canal de manière à mélanger ledit échantillon et ledit réactif,
  - c) on détecte au moins un paramètre physico-chimique dudit échantillon dans ledit canal.
16. Procédé selon l'une des revendications 14 ou 15 dans lequel la solution parcourt au moins une zone thermostatée de sorte que la solution est mise à une température déterminée lorsqu'elle parcourt ladite zone thermostatée.
17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 16 dans lequel la solution parcourt au moins une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées de sorte que la solution est mise successivement aux dites températures lorsqu'elle parcourt une fois ladite zone thermostatée.
18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17 dans lequel la solution parcourt une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé de telle sorte que la solution subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.
19. Procédé selon la revendication 18 dans lequel la solution subit de 1 à 35 fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.
20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 19 dans lequel on alimente séquentiellement ledit canal avec une pluralité d'échantillons séparés les uns des autres par des bouchons.
21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 20 dans lequel les étapes a), b) et éventuellement c) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

22. Procédé pour la réalisation en flux continu d'au moins un cycle de température sur une solution contenant au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) on alimente un canal en flux continu avec ladite solution,
- b) on fait parcourir à ladite solution une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé de telle sorte que la solution subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.

10

23. Procédé pour la réalisation en flux continu d'au moins un cycle de température sur une solution contenant au moins un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on alimente un canal en flux continu avec ladite solution,
- 15 b) on fait parcourir à ladite solution une zone thermostatée portée successivement à au moins deux températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé de telle sorte que la solution subit au moins une fois le cycle de température en parcourant une fois la zone thermostatée.
- c) on détecte au moins un paramètre physico-chimique dudit échantillon dans ledit canal.

20

24. Procédé selon l'une des revendications 22 ou 23 dans lequel on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.

25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 24 dans lequel on alimente séquentiellement ledit canal avec une pluralité d'échantillons séparés les uns des autres par des bouchons.

26. Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 25 dans lequel les étapes a), b) et éventuellement c) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

30

27. Procédé pour l'amplification d'acides nucléiques caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on mélange ledit acide nucléique avec des réactifs appropriés pour l'amplification d'acides nucléiques,
- b) on alimente un canal en flux continu avec le mélange réactionnel,
- c) on fait parcourir à ce mélange réactionnel une zone thermostatée portée successivement  
5 à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé,
- d) on choisit les températures et la durée du cycle de température de la zone thermostatée ainsi que le temps mis par le mélange pour parcourir la zone thermostatée de telle sorte que l'acide nucléique subit plusieurs fois le cycle dénaturation-hybridation-élongation.
- 10
28. Procédé pour l'amplification d'acides nucléiques caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution comprenant ledit acide nucléique,
- 15 b) on injecte au moins un réactif approprié pour l'amplification d'acides nucléiques à partir d'au moins un réservoir à réactif dans ledit canal de manière à mélanger ledit acide nucléique et ledit réactif,
- c) on fait parcourir à ce mélange réactionnel une zone thermostatée portée successivement à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant un cycle  
20 prédéterminé,
- d) on choisit les températures et la durée du cycle de température de la zone thermostatée ainsi que le temps mis par le mélange pour parcourir la zone thermostatée de telle sorte que l'acide nucléique subit plusieurs fois le cycle dénaturation-hybridation-élongation.
- 25 29. Procédé selon la revendication 27 ou 28 dans lequel on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.
- 30 30. Procédé selon l'une des revendications 27 à 29 dans lequel ledit canal est formé dans un substrat en silicium.
31. Procédé selon l'une quelconque des revendications 27 à 30 dans lequel on alimente séquentiellement ledit canal avec une pluralité d'acides nucléiques séparés les uns des autres par des bouchons.

32. Procédé selon l'une quelconque des revendications 27 à 31 dans lequel les étapes a), b), c) et d) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

- 5 33. Procédé pour la détection en flux continu d'au moins un nucléotide dans au moins un acide nucléique cible caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution comprenant ledit acide nucléique ;
- b) on injecte le réactif de microséquençage comprenant le tampon de microséquençage, l'amorce de microséquençage, au moins un ddNTP et une polymérase, dans ledit canal  
10 de manière à mélanger ledit acide nucléique et ledit réactif;
- c) on fait parcourir à la solution au moins une zone thermostatée de façon à obtenir au moins un cycle comprenant la dénaturation de l'acide nucléique cible, l'hybridation dudit acide nucléique avec l'amorce de microséquençage et l'incorporation du ddNTP,  
15 complémentaire au nucléotide à détecter, à l'extrémité 3' de ladite amorce ;
- d) on détecte au moins un ddNTP incorporé à l'extrémité 3' de l'amorce de microséquençage.

20 34. Procédé selon la revendication 33 dans lequel on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.

25 35. Procédé selon l'une des revendications 33 ou 34 dans lequel à l'étape c) la zone thermostatée est portée successivement à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant au moins un cycle.

30 36. Procédé selon l'une des revendications 33 à 35 dans lequel les ddNTPs sont marqués avec des fluorophores et dans lequel à l'étape d) on détecte la fluorescence du ddNTP incorporé.

37. Procédé selon l'une quelconque des revendications 33 à 36 dans lequel les étapes a), b), c) et d) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en parallèle.

38. Procédé pour la détection en flux continu d'au moins un nucléotide dans au moins un acide nucléique cible caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) on alimente un canal en flux continu avec une solution contenant au moins un acide nucléique cible ;
  - 5 b) on injecte le réactif pour l'amplification de la région de l'acide nucléique cible portant au moins un nucléotide à détecter, dans ledit canal à partir d'un premier réservoir à réactif;
  - c) on fait parcourir à la solution au moins une zone thermostatée de telle sorte que l'acide nucléique subit plusieurs fois le cycle dénaturation-hybridation-élongation;
  - 10 d) on injecte le réactif pour la purification du produit d'amplification dans ledit canal à partir d'un deuxième réservoir à réactif;
  - e) on fait parcourir à la solution au moins une zone thermostatée pour réaliser la réaction de purification ;
  - f) on injecte le réactif de microséquençage comprenant le tampon de microséquençage, l'amorce de microséquençage, au moins un ddNTP et une polymérase, dans ledit canal  
15 à partir d'un troisième réservoir à réactif;
  - g) on fait parcourir au mélange réactionnel au moins une zone thermostatée de façon à obtenir au moins un cycle comprenant la dénaturation de l'acide nucléique cible, l'hybridation dudit acide nucléique avec l'amorce de microséquençage et  
20 l'incorporation du ddNTP, complémentaire au nucléotide à détecter, à l'extrémité 3' de ladite amorce ;
  - h) on détecte au moins un ddNTP incorporé à l'extrémité 3' de l'amorce de microséquençage.
- 25 39. Procédé selon la revendication 38 dans lequel on alimente le canal en flux continu en appliquant une différence de pression entre la cuvette d'alimentation et la cuvette de sortie dudit canal.
40. Procédé selon l'une des revendications 38 à 39 dans lequel aux étapes c) et e) la zone  
30 thermostatée est portée successivement à des températures déterminées suivant une succession temporelle formant au moins un cycle.

41. Procédé selon l'une des revendications 38 à 40 dans lequel les ddNTPs sont marqués avec des fluorophores et dans lequel à l'étape h) on détecte la fluorescence du ddNTP incorporé.
- 5 42. Procédé selon l'une des revendications 38 à 41 dans lequel le réactif pour la purification comprend une exonucléase et une alcaline phosphatase.
43. Procédé selon l'une quelconque des revendications 38 à 42 dans lequel les étapes a), b), c), d), e), f), g) et h) sont réalisés simultanément sur une pluralité de canaux disposés en
- 10 parallèle.



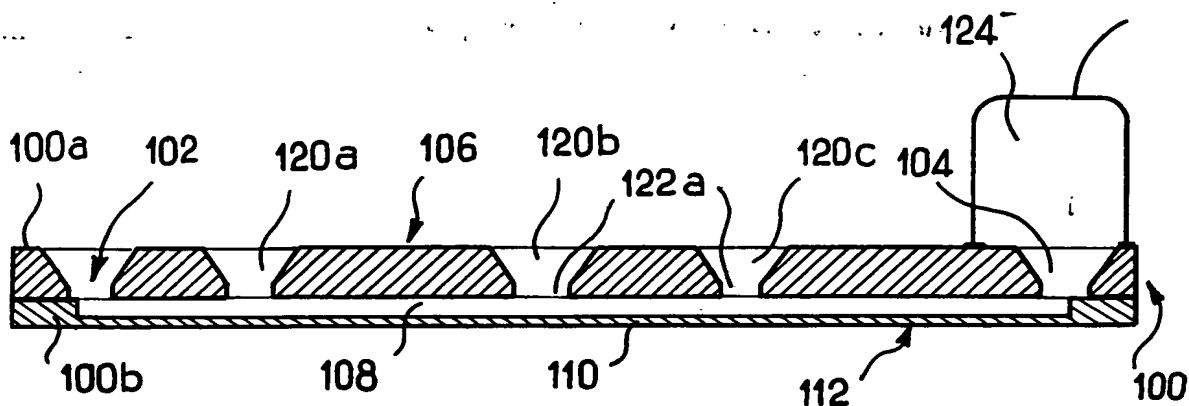


FIG. 1A

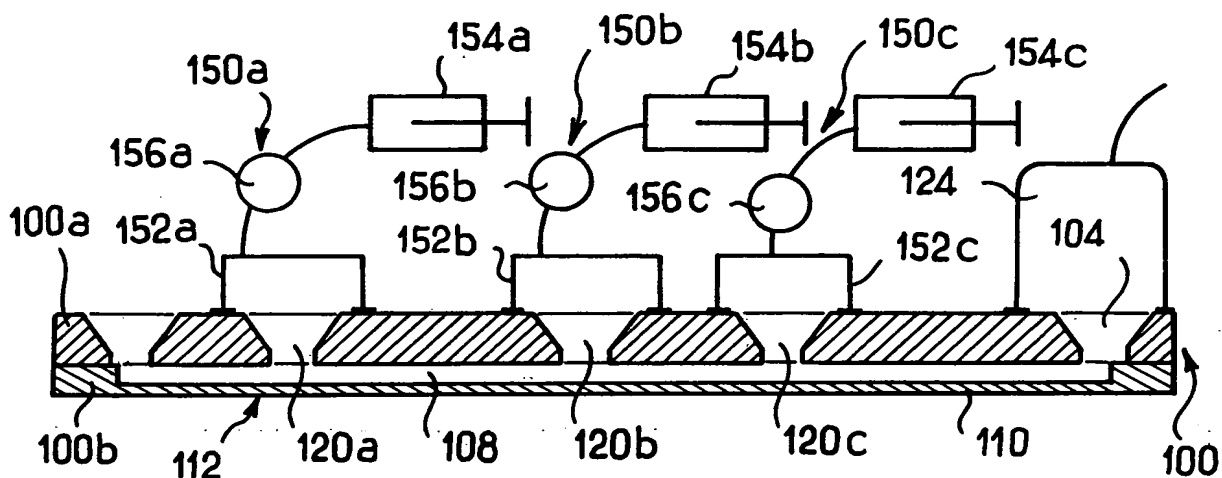


FIG. 1B

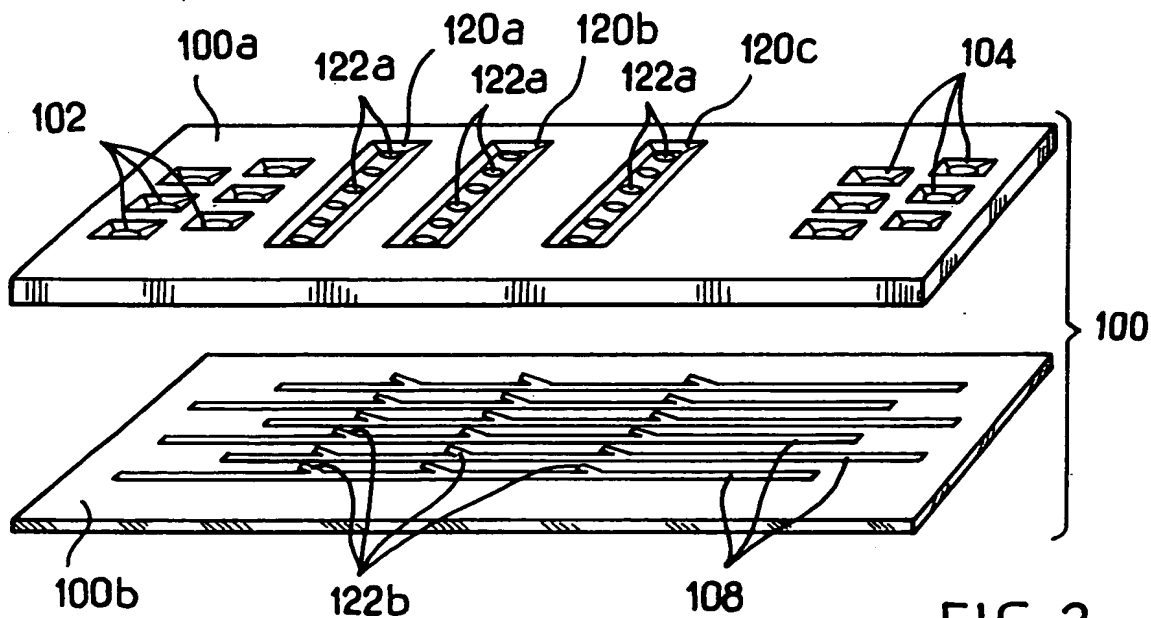


FIG. 2

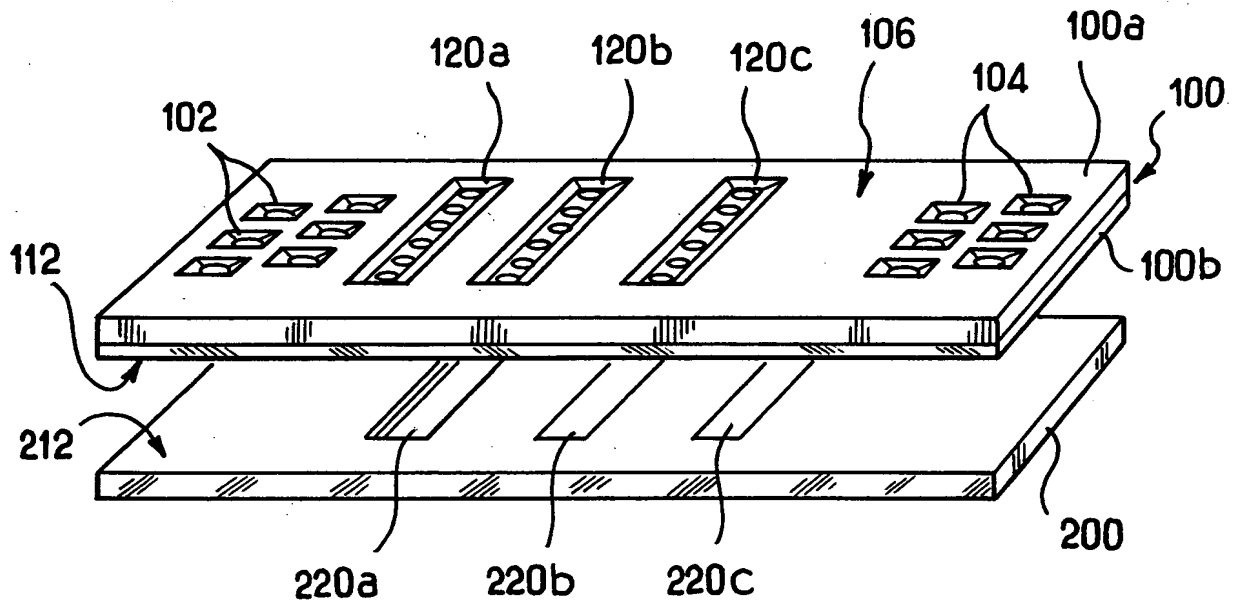


FIG. 3

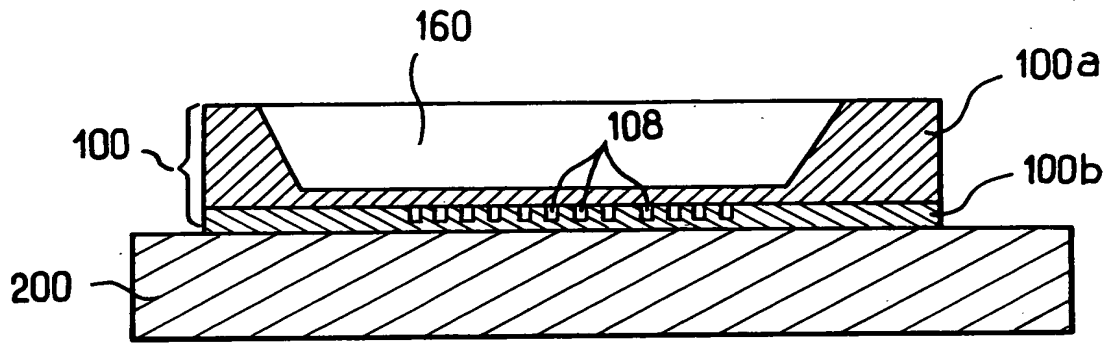


FIG. 4

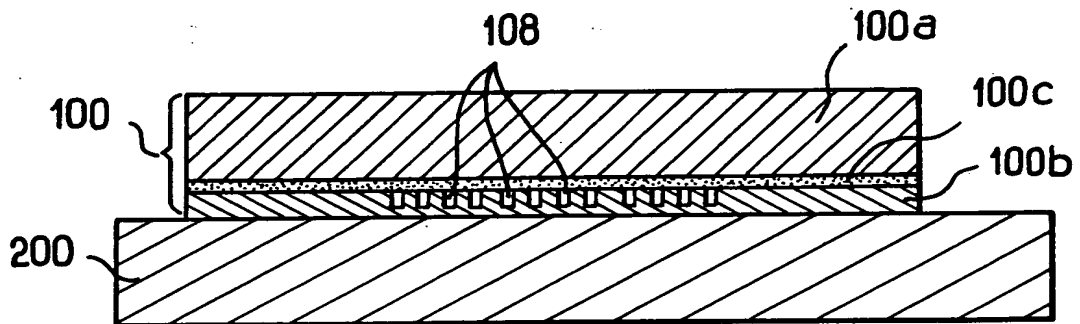


FIG. 5

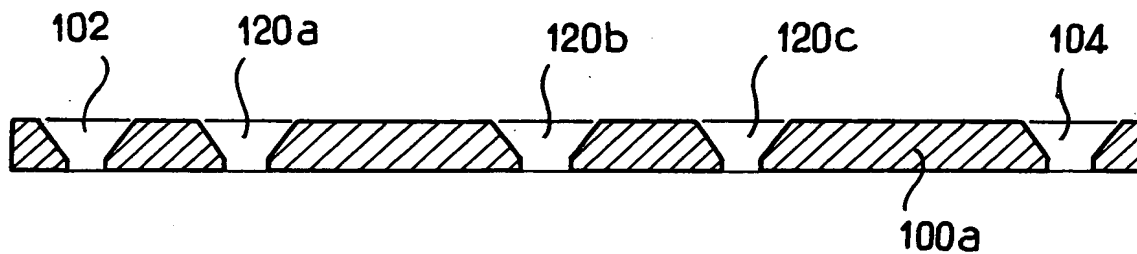


FIG. 6

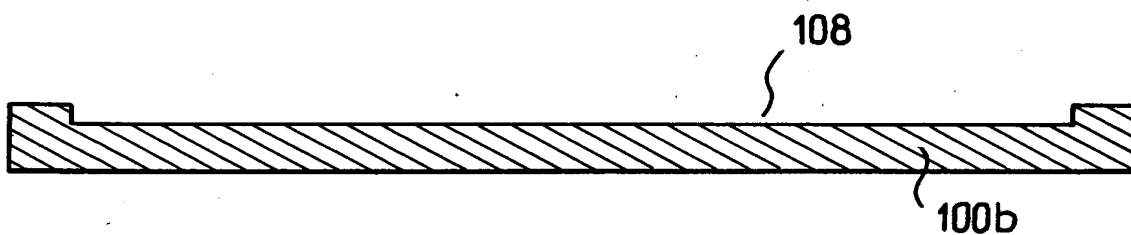


FIG. 7

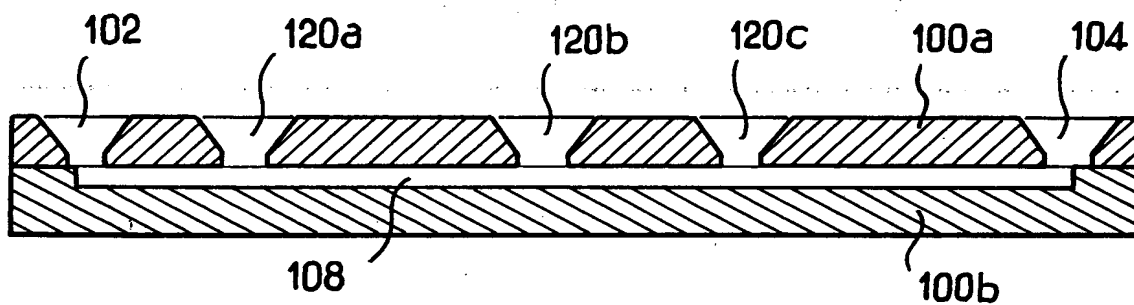


FIG. 8

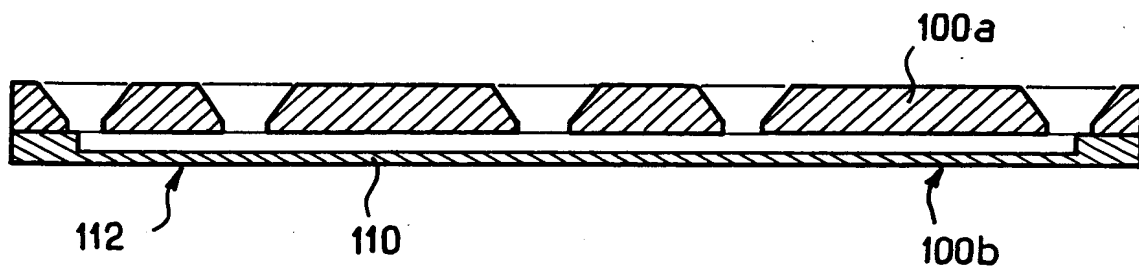


FIG. 9

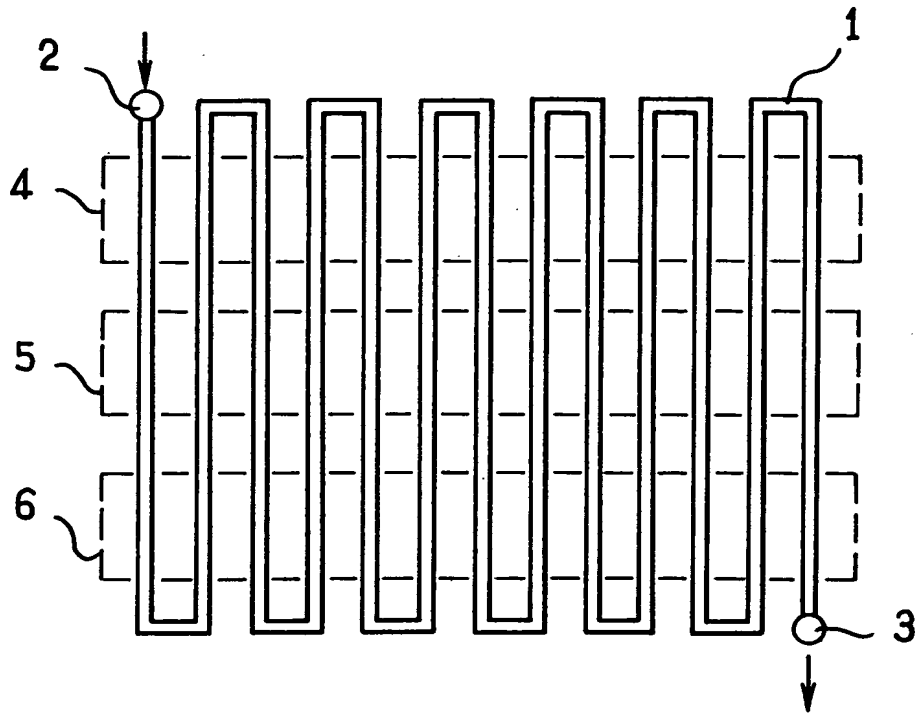


FIG. 10

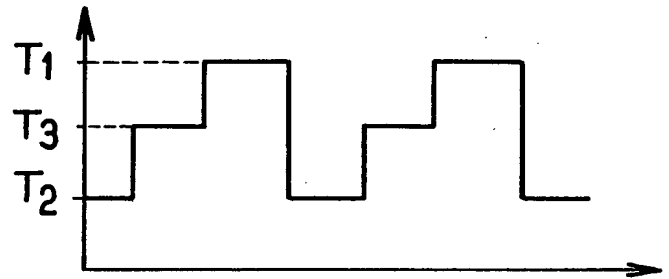
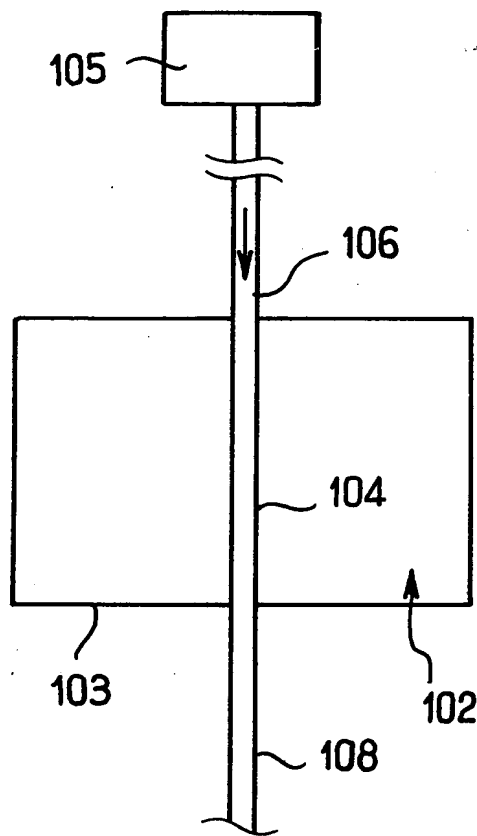


FIG. 11

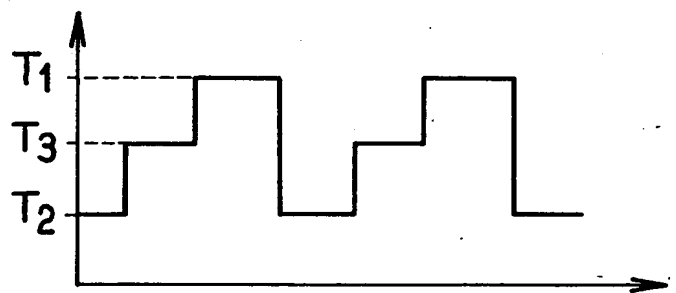
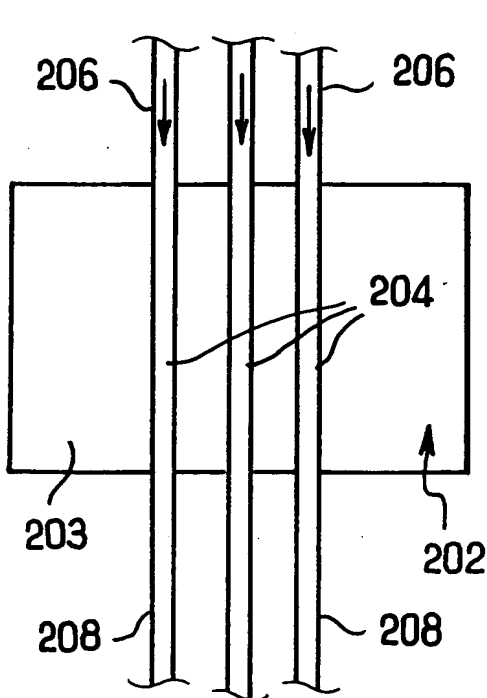


FIG. 12

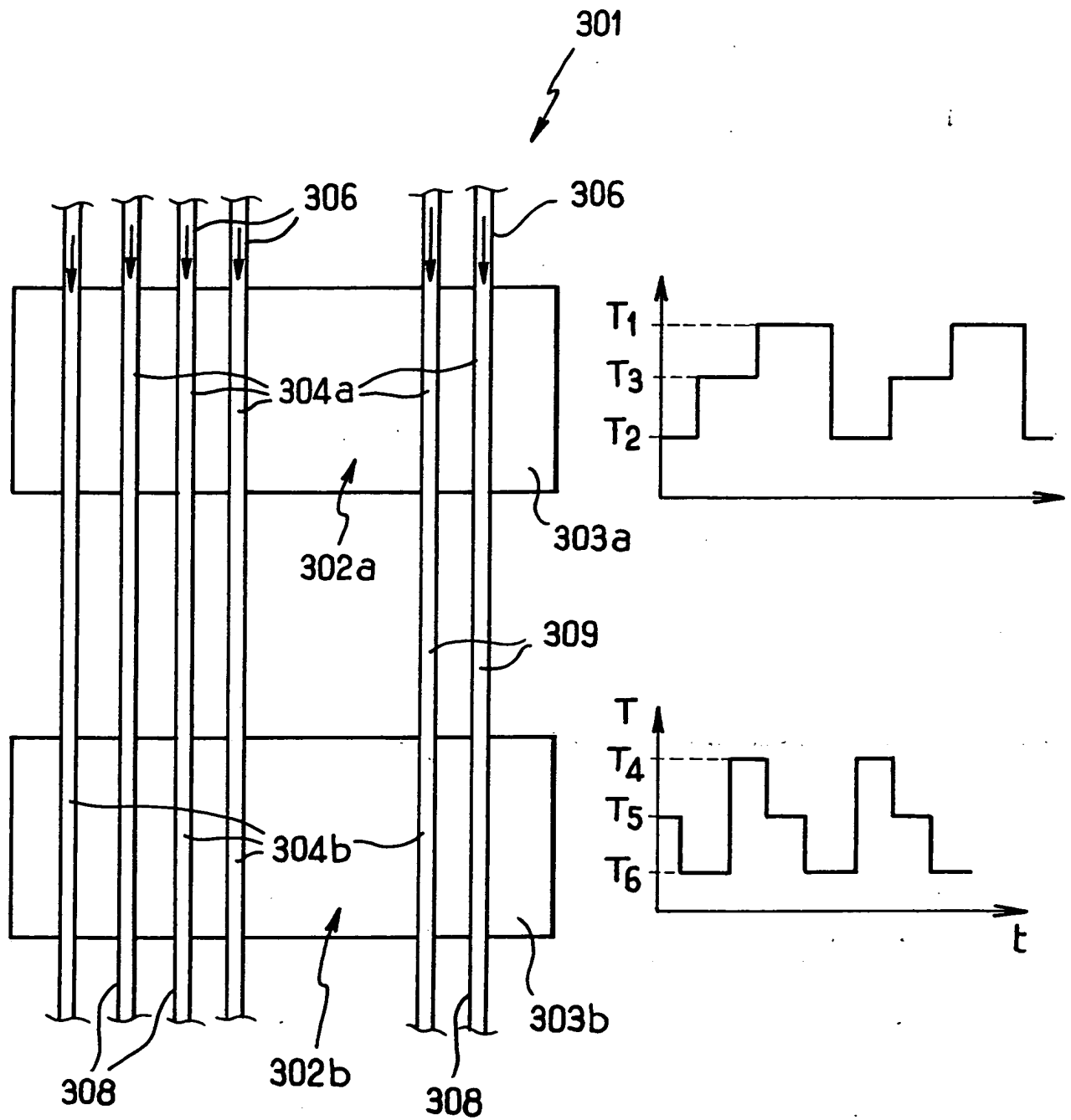


FIG. 13

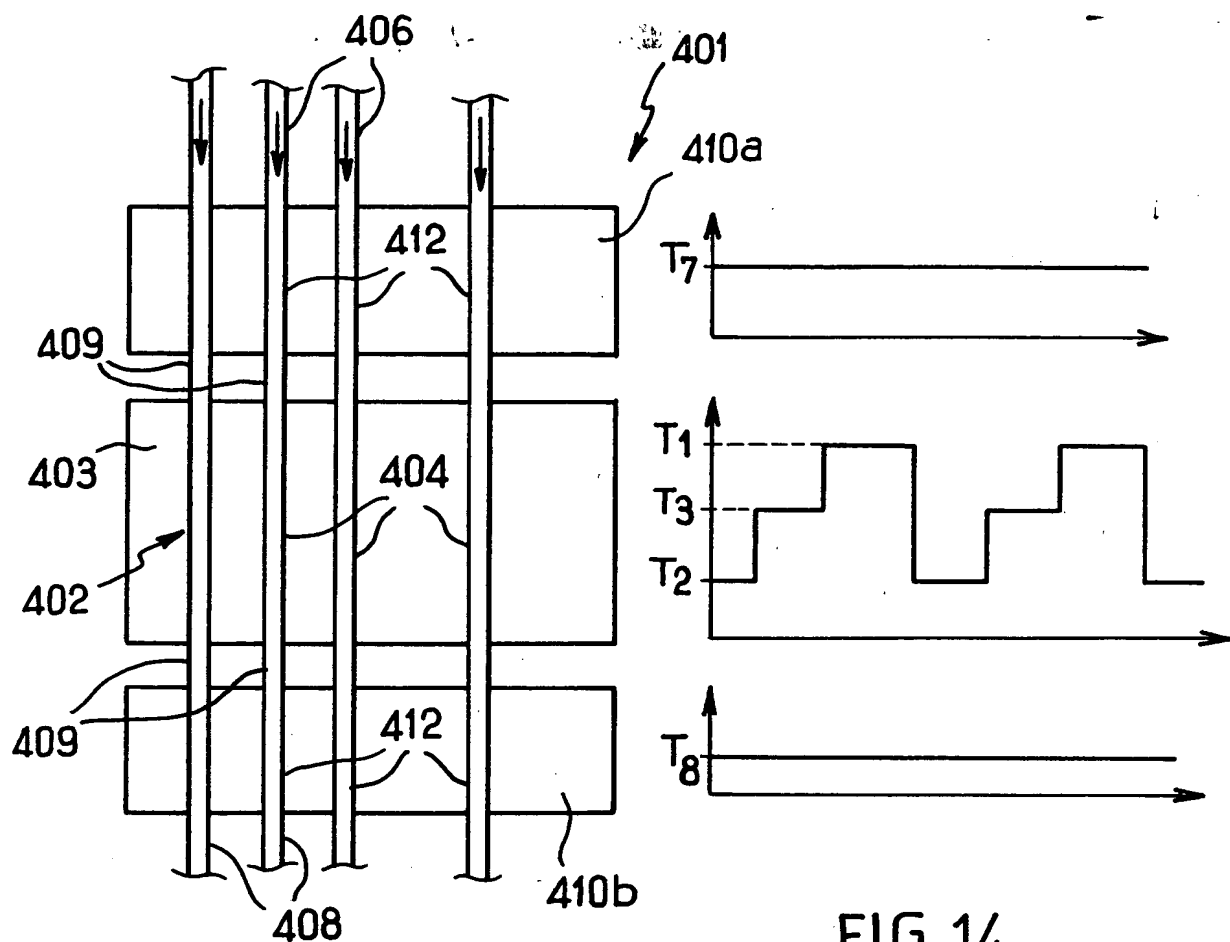


FIG. 14

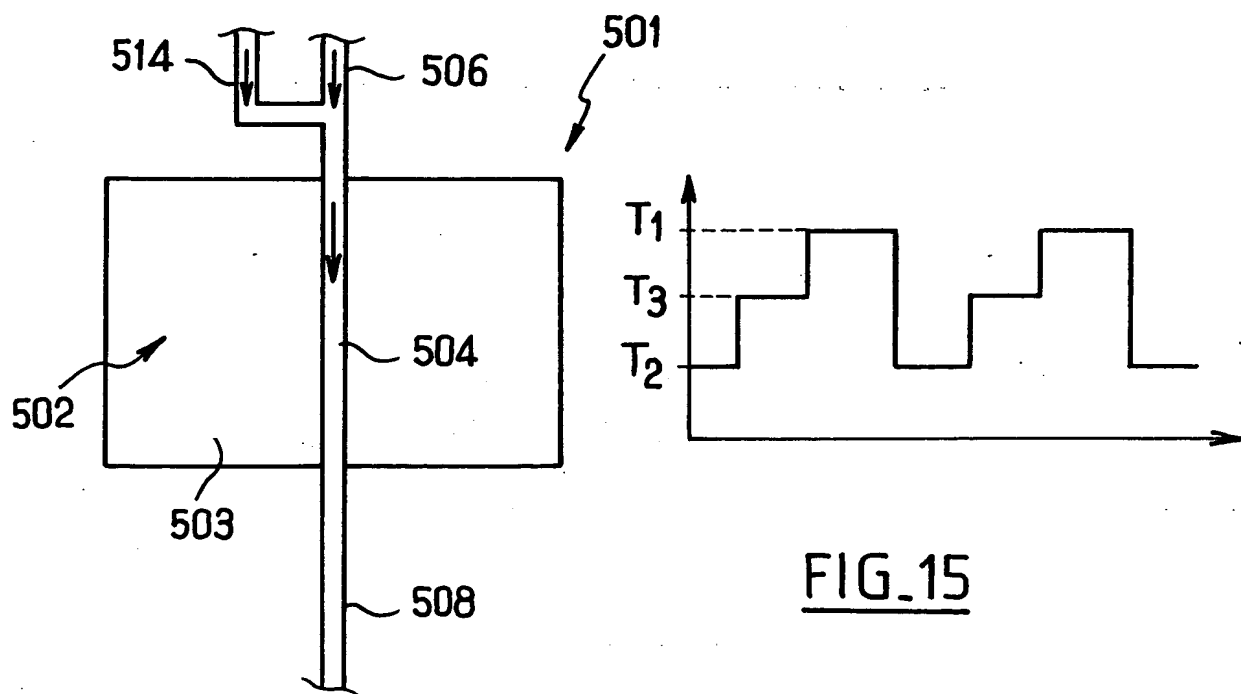
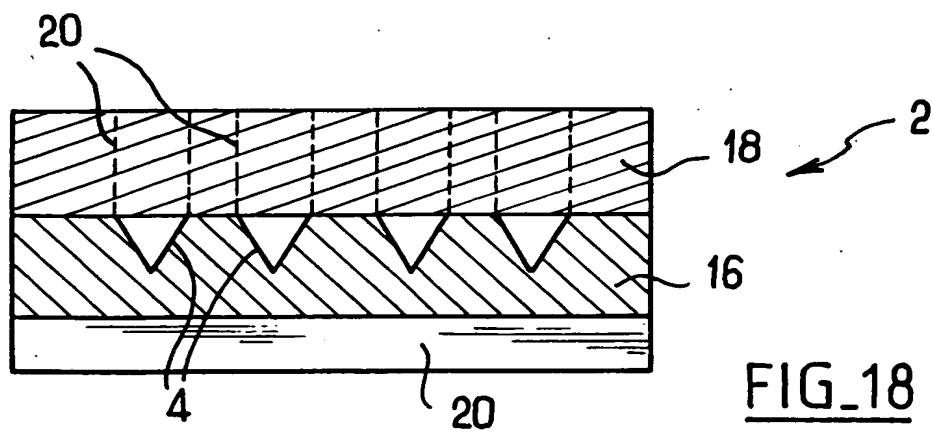
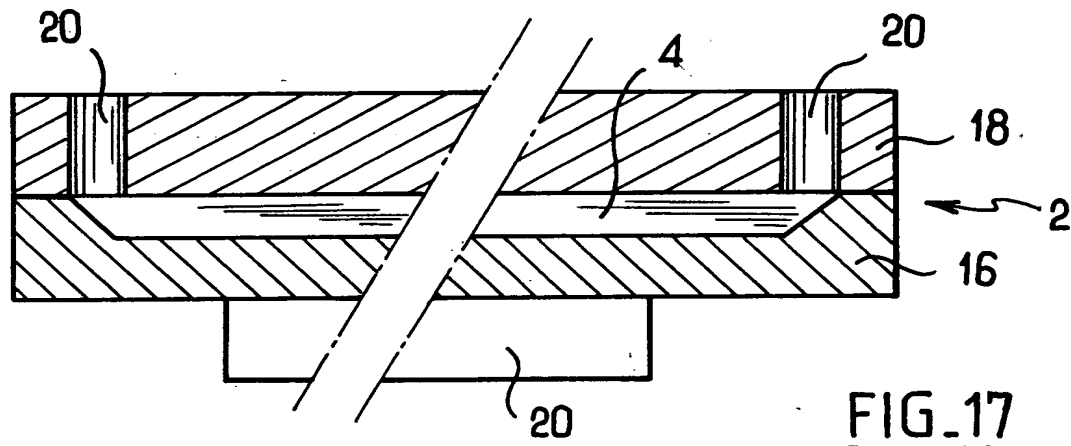
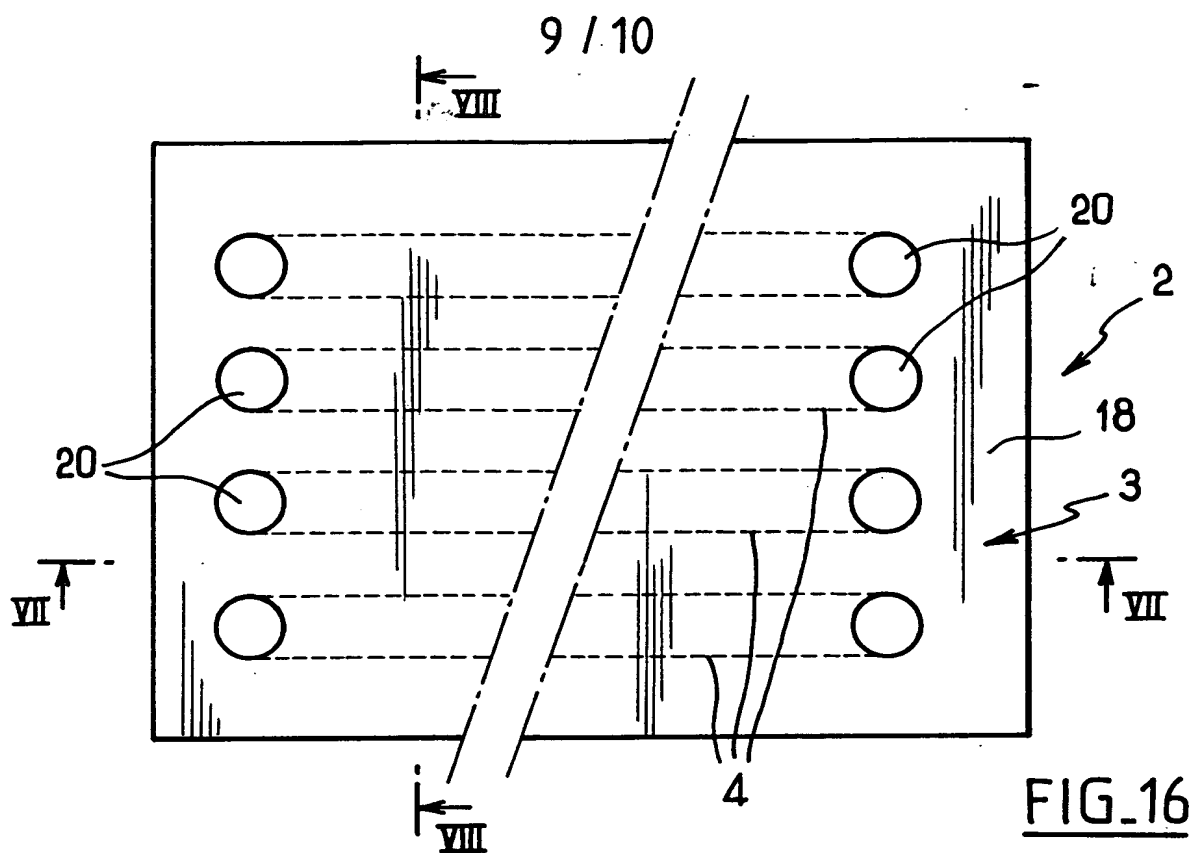


FIG. 15





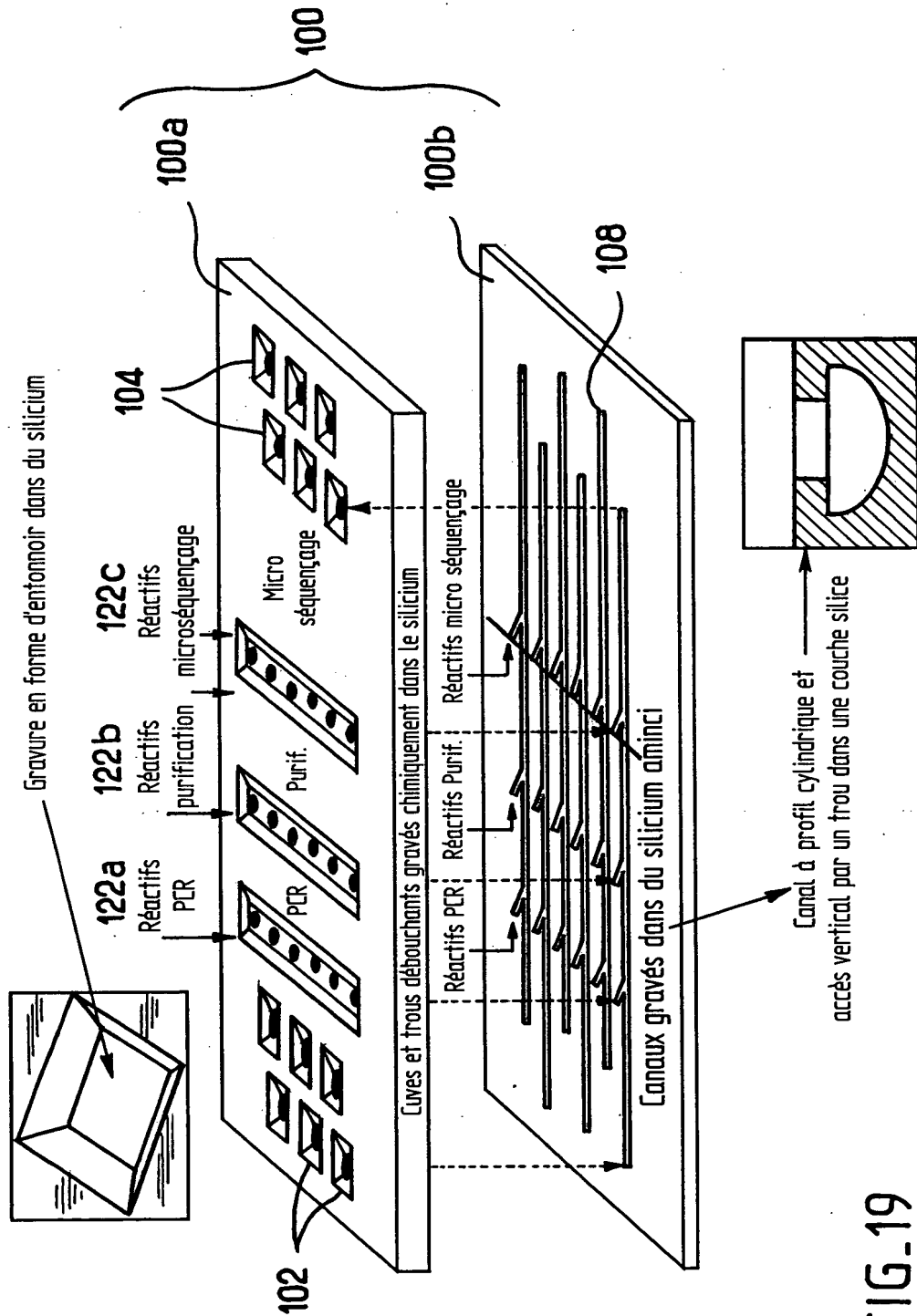


FIG. 19